Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZÜRICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

W. RUHLAND UNTERDEUFSTETTEN — **L. BRAUNER** MÜNCHEN — **E. BÜNNING** TÜBINGEN

49. BAND, 6. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 26 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 5. SEPTEMBER 1957)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1957

Planta (Berl.)

Preis DM 21.–

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E). Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*.

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotographien u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Inst. der Universität.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

49. Band **Inhaltsverzeichnis** 6. (Schluß-)Heft

Jacobi, G., Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels in Ulva lactuca. Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen. Mit 1 Textabbildung 561

Friederichsen, I., und H. Engel, Beiträge zur Kenntnis des Abschußrhythmus und des Farbstoffs von Sphaerobolus stellatus (Thode) Pers. Mit 3 Textabbildungen 578

Wiedow-Pätzold, H.-L., und H. v. Guttenberg, Weitere Untersuchungen über den nativen Wuchsstoff 588

Muschik, M., Entwicklungsmorphologische Studien am Vegetationskegel von Hordeum distichum (Ackermanns ISARIA-Gerste) in Abhängigkeit von Tageslänge und Lichtintensität. Mit 7 Textabbildungen 598

Youssef, E., und O. Kiermayer, Zur Photolyse von Indol-3-acetonitril. Mit 1 Textabbildung. 607

Tranquillini, W., Standortsklima, Wasserbilanz und CO_2-Gaswechsel junger Zirben (Pinus cembra L.) an der alpinen Waldgrenze. Mit 14 Textabbildungen 612

Autorenverzeichnis 662

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta, Bd. 49, S. 561—577 (1957)

Aus der Botanischen Abteilung des Institutes für Meereskunde der Universität Kiel

ENZYME DES AMINOSÄURE-STOFFWECHSELS IN ULVA LACTUCA. TRANSAMINASEN UND AMINOSÄURE-DEHYDROGENASEN

Von

GÜNTER JACOBI

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 14. Mai 1957)

I. Einleitung

Ein Einblick in das intermediäre Zellgeschehen von Objekten, deren Stoffwechsel noch wenig bekannt ist, wird vorzugsweise durch jene Substanzen vermittelt, die auf verschiedenen Reaktionswegen einen Umsatz erfahren. Für die Verknüpfung von Kohlenhydrat- und Aminosäurestoffwechsel ist die Bedeutung der Ketosäuren, welche in die Transaminierung und in die reduktive Aminierung eingreifen, bekannt. Die den drei wesentlichsten Ketosäuren des Kohlenhydratstoffwechsels, α-Ketoglutarsäure, Oxalessigsäure und Brenztraubensäure, entsprechenden Aminosäuren, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin, nehmen hinsichtlich ihrer Konzentration den größten Raum unter den freien Aminosäuren ein. Die Glutaminsäure zeichnet sich durch die Mannigfaltigkeit ihrer Reaktionsmöglichkeiten besonders aus, so daß dieser Substanz eine zentrale Stellung unter den Aminosäuren zukommt.

Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen sind wiederholt in tierischen und pflanzlichen Geweben nachgewiesen worden. Während man für die Umaminierung jedoch ursprünglich annahm, daß sich die Aminogruppenübertragung nur zwischen den Reaktionspartnern Glutaminsäure, Asparaginsäure und Alanin einerseits, sowie α-Ketoglutarsäure, Oxalessigsäure und Brenztraubensäure andererseits vollzieht, ist in den letzten Jahren bekannt geworden, daß sämtliche natürlichen Aminosäuren in Transaminierungsreaktionen eingreifen (MEISTER 1955). Die reduktive Aminierung wurde dagegen fast ausschließlich für α-Ketoglutarsäure beschrieben; nur KRITZMANN (1947) berichtete über eine Aminierung von Oxalessigsäure in tierischen Geweben.

Für die höheren Pflanzen konnte der universelle Transaminierungsmechanismus von WILSON, KING und BURRIS (1954) bestätigt werden. Ein Vergleich von Transaminierung und reduktiver Aminierung durch diese Autoren ließ auf Grund der Messung des Einbaues von markiertem Kohlenstoff in die Aminosäuren den Schluß zu, daß die Aminosäure-Dehydrogenasen eine wesentlich geringere Aktivität als die Trans-

aminasen aufweisen. Nach den Ergebnissen von ROGERS (1955) erfolgt in Homogenaten von Maiskeimlingen relativ zur oxydativen Desaminierung eine starke Decarboxylierung von Aminosäuren. Aus diesen Untersuchungen wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die oxydative Desaminierung bzw. reduktive Aminierung im pflanzlichen Stoffwechsel von untergeordneter Bedeutung ist (WEBSTER 1955).

Mit niederen Pflanzen sind in dieser Hinsicht kaum Studien durchgeführt worden. In einer kurzen Mitteilung berichtete MILLBANK (1953) über den qualitativen Nachweis von Transaminasen in *Chlorella* mit relativ wenigen Aminosäuren. Außer der Angabe von WATANABE (1947) über den Nachweis der Glutaminsäure-Dehydrogenase in *Ulva lactuca* fehlt für die Meeresalgen jeder Hinweis über den fermentativen Aminosäureumsatz, obwohl die freien und gebundenen Aminosäuren in verschiedenen Formen wiederholt erfaßt wurden (MAZUR und CLARKE 1938, TAKAGI 1951, ERICSON und SJÖSTRÖM 1952, SMITH und YOUNG 1953, 1955, CHANNING und YOUNG 1953, JACOBI 1956). Es schien daher wünschenswert, einen Einblick in den intermediären Aminosäure-Stoffwechsel einer marinen Alge durch Messung der Fermentaktivitäten von Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen zu gewinnen. In zellfreien Extrakten der Grünalge *Ulva lactuca* wurden beide Fermenttypen getestet, worüber in der vorliegenden Arbeit berichtet wird. Eine kurze Mitteilung über einige Ergebnisse wurde kürzlich veröffentlicht (JACOBI 1957).

II. Material und Methodik

Sämtliche Untersuchungen wurden mit zellfreien Extrakten von *Ulva lactuca* durchgeführt. Die Pflanzen wurden in der Kieler Förde gesammelt und einzeln in Schreiber-Lösung aufbewahrt. In diesem Medium zeigten die Objekte ein gutes Wachstum und ließen sich während der Wintermonate gut kultivieren. Die Zerkleinerung der Thalli erfolgte unter Zusatz von Puffer im Homogenisator nach POTTER-ELVEHJEM unter ständigem Kühlen. Das Verhältnis Puffer: Pflanzenmaterial betrug für die chromatographischen Untersuchungen 9:1, für die quantitativen Teste 4:1. Die für die chromatographischen Nachweise hergestellten Homogenate wurden auf einer Laborzentrifuge bei 3000 U/min, für die quantitativen Messungen auf einer hochtourigen Zentrifuge bei 15000 U/min (30000 × g) bei 0° (Eispirouette der Firma Phywe A.G.) abzentrifugiert. Für die chromatographische Analyse wurden die Überstände gegen 0,005 mol Diäthanolaminpuffer p_H 8,4 über 18 h dialysiert.

Der Ansatz für den qualitativen Nachweis von Transaminasen mittels der Papierchromatographie war: 0,50 ml Extrakt, 0,1 ml 0,5 mol Ketosäure, 0,1 ml 0,5 mol Aminosäure, 0,02 ml Pyridoxalphosphat (= 30 γ) und 0,28 ml 0,5 mol Diäthanolaminpuffer p_H 8,4. Dieser Ansatz wurde 18 Stunden stehen gelassen und die Reaktion mit 2 ml heißem Äthylalkohol abgestoppt. Nach Zusatz von 8 ml Chloroform scheidet sich eine wäßrige Phase ab, in der sich die zu untersuchenden Aminosäuren befinden. Von diesem wäßrigen Auszug wurden 0,01 und 0,03 ml auf das Chromatographiepapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043b mgl) aufgetragen und aufsteigend eindimensional die Aminosäuren getrennt. Je nach den R_f-Werten

der Aminosäuren in den Lösungsmittelgemischen wurde entweder in Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) oder in Pyridin-Amylalkohol-Wasser (7:6:6) entwickelt. Die Entwicklung wurde nach eingeschaltetem Trocknen wiederholt. Die Anfärbung erfolgte mit 0,2%iger Ninhydrinlösung in Methanol.

Für die quantitativen Aktivitätsmessungen von Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen wurde der optische Test von WARBURG und CHRISTIAN (1936) angewandt. Die Bestimmungen erfolgten im Photometer „Eppendorf" durch Messung der Extinktionsabnahme des reduzierten DPN und TPN bei 366 mμ pro 30 Sekunden. Die Aktivität (A) läßt sich aus dem molaren Extinktionswert von DPN_{red} und TPN_{red} bei 366 mμ errechnen.

$$\text{Mole } DPN_{red} \text{ (bzw. } TPN_{red}/\text{ml}) = \frac{\Delta E}{3{,}44 \times 10^6};$$

Da äquivalente Mengen an Aminosäure bzw. Ketosäure und DPNH (oder TPNH) umgesetzt werden, kann diese Formel für die Umwandlung von Substrat direkt verwandt werden. Die Aktivität von 1 ml Extrakt wird in Mole umgesetztes Substrat pro Stunde angegeben; der Ausdruck $Q_{Ferment}$ gibt den Umsatz an Substrat pro Stunde und Gramm Protein wieder.

$$Q_{Ferment} = \frac{\text{Mole umgesetzter Aminosäure (bzw. aminierte Ketosäure)}}{\text{Stunde} \times \text{Gramm Protein}}.$$

Bei der Bestimmung der Transaminaseaktivität wurde in einem kombinierten Testverfahren die gebildete Ketosäure in einer DPNH-abhängigen Reaktion durch Einsatz des entsprechenden Enzyms weiter hydriert. Die für die Bestimmung der Glutamat-Aspartat-Transaminase benötigte Äpfelsäure-Dehydrogenase wurde nach STRAUB (1941), in der Abänderung von OCHOA (1955) hergestellt. Milchsäure-Dehydrogenase, zur Bestimmung der Glutamat-Alanin-Transaminase, sowie Glutaminsäure-Dehydrogenase wurden von der Firma Boehringer bezogen. Die Ketosäuren waren Produkte der Firmen Fluka und Boehringer, Aminosäuren und Pyridoxalphosphat der Firma La Roche. DPN (Boehringer) wurde mit Dithionit reduziert; das für die Messungen der Aminosäure-Dehydrogenasen benötigte TPN_{red} war ein enzymatisch reduziertes Produkt der Firma Sigma Chem. Co (USA). Einzelheiten der Teste sind im Versuchsteil wiedergegeben.

Die Proteinbestimmung wurde bei 546 mμ mit der Biuretmethode durchgeführt. Da Triäthanolaminpuffer und Diäthanolaminpuffer eine Eigenextinktion im Meßbereich besitzen, wurden die Proteine aus den Extrakten vorher mit Trichloressigsäure ausgefällt; das abzentrifugierte Präcipitat löst sich im Biuretreagens Einsatz verschiedener Proteinmengen ergab Proportionalität.

III. Versuchsteil

a) Transaminasen.

Es wurden zunächst 17 Aminosäuren hinsichtlich ihrer Fähigkeit, mit α-Ketoglutarsäure und Brenztraubensäure Transaminierungsreaktionen einzugehen, qualitativ bestimmt. Da die Intensität der mit Ninhydrin angefärbten Aminosäuren auf dem Papier bereits einen Hinweis für die Aktivität der entsprechenden Fermente vermittelt,

sind in Tabelle 1 die Befunde in dieser Hinsicht ausgewertet. Die mit (+) aufgeführten Ergebnisse deuten auf eine ganz schwache Reaktion hin. In der Spalte der α-Ketoglutarsäure ist das Auftreten von Glutaminsäure, in derjenigen der Brenztraubensäure das von Alanin aufgeführt. In jeder Versuchsreihe wurden Vergleichsproben mit Ketosäure ohne Aminosäurezusatz angesetzt, um eventuelle Blindreaktionen im Laufe der langen Versuchszeit von 18 Stunden zu erfassen. Diese Vergleichsproben waren stets negativ.

Tabelle 1. *Qualitativer Nachweis von Transaminierungsreaktionen in Ulva lactuca*

	α-Ketoglutarsäure	Brenztraubensäure
Alanin	+	—
Asparaginsäure	+++	+
Arginin	+	(+)
α-Aminobuttersäure	+	+
Cystin	+	—
Glycin	+	+
Histidin	+	—
Isoleucin	++	+
Leucin	++	(+)
Methionin	++	(+)
Phenylalanin	+	(+)
Serin	+	+
Threonin	++	—
Tryptophan	—	—
Tyrosin	—	—
Valin	++	+

Das Ergebnis zeigt, daß auch in der Meeresalge *Ulva lactuca* eine große Zahl von Aminosäuren sowohl mit α-Ketoglutarsäure als auch mit Brenztraubensäure Transaminierungsreaktionen eingehen. Im Vergleich zu den Umsetzungen mit Brenztraubensäure sind die mit α-Ketoglutarsäure reagierenden Fermente wesentlich aktiver. Bereits aus den qualitativen Ergebnissen läßt sich ersehen, daß von den bestimmten Fermenten die Glutamat-Asparat-Transaminase am aktivsten ist. Aus der Intensität der Aminosäurenflecke konnte ferner auf kräftige Reaktionen zwischen α-Ketoglutarsäure und Isoleucin, Leucin, Methionin Threonin und Valin geschlossen werden. Mit Ausnahme von Tryptophan und Tyrosin werden sämtliche hier ausgetesteten Aminosäuren mit α-Ketoglutarsäure umgesetzt. Dagegen sind die Umaminierungsvorgänge mit Brenztraubensäure wesentlich schwächer. Der negative Befund mit Cystin, Histidin, Threonin, Tryptophan und Tyrosin sowie die schwache Reaktion mit Arginin, Leucin, Methionin und Phenylalanin deutet darauf hin, daß die Transaminierung mit dieser Ketosäure gegenüber der mit α-Ketoglutarsäure im Stoffwechsel von *Ulva lactuca* von untergeordneter Bedeutung ist.

Während der papierchromatographische Nachweis nur Anhaltspunkte qualitativer Natur liefert, konnte mit der spektrophotometrischen Methode eine quantitative Aussage gemacht werden. Es wurde ein kombinierter optischer Test angewandt, der in dieser Form durch STEINBERG und OSTROW (1956) bei der Messung der Glutamat-Aspartat-Transaminase in Humanserum für diagnostische Zwecke Verwendung

fand. Mit dem gleichen Test haben WIELAND. GRUBER und PFLEIDERER (1955) durch Einsetzen von Transaminase und Äpfelsäure-Dehydrogenase l-Asparaginsäure quantitativ bestimmt.

Bei der Bestimmung der Glutamat-Aspartat-Transaminase, welche die Reaktion

α-Ketoglutarsäure + Asparaginsäure ⇌ Asparaginsäure + Oxalessigsäure

katalysiert, wird die gebildete Oxalessigsäure durch Äpfelsäure-Dehydrogenase hydriert:

Oxalessigsäure + DPNH ⇌ Äpfelsäure + DPN.

Der Versuchsansatz war — mit Ausnahme variierender Mengen an Extrakt und Puffer — für sämtliche Teste der Glutamat-Aspartat-Transaminase folgender:

0,09 ml DPNH (= 0,87 μMol/Küvette = 1,000 Δ E)
0,02 ml Pyridoxalphosphat (30 γ/Küvette)
0,06 ml Äpfelsäure-Dehydrogenase (verdünnt in Puffer)
0,05 ml 0,5 mol Asparaginsäure
0,02 ml 0,5 mol α-Ketoglutarsäure
0,01 ml Extrakt
2,75 ml Puffer

Volumen = 3,00 ml Schichtdicke d = 1 cm 366 mμ

Die Zugabe des Substrates erfolgt erst, wenn bereits Ferment und Coferment in der Küvette enthalten waren, der Reaktionsstart erst nach gemessener Blindreaktion mit α-Ketoglutarsäure. Durch diese Reihenfolge des Einsetzens konnte die von O'KANE und GUNSALUS (1947) sowie von MEISTER und Mitarb. (1952, 1954) gemessene Inkubationsperiode bis zur Erreichung der Maximalgeschwindigkeit unterbunden werden. Sämtliche gemessenen Fermentreaktionen waren proportional der eingesetzten Enzymmenge.

Bei der Messung der Glutamat-Alanin-Transaminase wird die gebildete Brenztraubensäure durch Milchsäure-Dehydrogenase zu Milchsäure hydriert:

α-Ketoglutarsäure + Alanin ⇌ Glutaminsäure + Brenztraubensäure
Brenztraubensäure + DPNH ⇌ Milchsäure + DPN^+

Mit diesen Testen konnten die Bedingungen für die Extraktion sowie für die Aktivitätsbestimmung festgelegt werden. Da in Vorversuchen festgestellt wurde, daß beide Fermente hinsichtlich des Einflusses des Extraktionspuffers auf die Aktivität die gleichen Eigenschaften aufweisen, wurde diese Frage nur an der Glutamat-Aspartat-Transaminase eingehend geprüft. Folgende Puffer kamen zur Anwendung: 0,2 mol Diäthanolaminpuffer p_H 8,4, 0,2 mol Triäthanolaminpuffer p_H 7,4, 0,2 mol Phosphatpuffer p_H 7,4 und 0,25%ige Na_2CO_3-Lösung p_H 10,2. Die Extraktion mit der Carbonatlösung erfolgte auf

Grund der Angabe von DUNCAN, MANNERS und ROSS (1956), die mit dieser Lösung die größte Proteinausbeute aus Meeresalgen nachweisen konnten. In Tabelle 2 sind die Proteinwerte pro ml Extrakt, die Aktivität (A) pro ml Extrakt und der Umsatz in Molen Substrat pro Stunde und Gramm Protein ($Q_{Ferment}$) zusammengestellt. (Wegen der Definition und der Auswertung s. oben.)

Tabelle 2. *Einfluß verschiedener Extraktionspuffer auf die Aktivität der Glutamat-Aspartat-Transaminase*

Extraktionspuffer	mg Protein pro ml	A	$Q_{Ferment}$	Testpuffer
0,2 mol DAP p_H 8,4	2,75	$1{,}31 \times 10^{-4}$	$4{,}75 \times 10^{-2}$	DAP, TRAP
0,2 mol TRAP p_H 7,4	1,10	$4{,}5 \times 10^{-5}$	$4{,}1 \times 10^{-2}$	TRAP
0,2 mol Phosphatpuffer p_H 7,4	2,72	$4{,}77 \times 10^{-5}$	$1{,}97 \times 10^{-2}$	TRAP
0,25% Na_2CO_3 p_H 10,2 . . .	3,79	$4{,}76 \times 10^{-5}$	$1{,}26 \times 10^{-2}$	TRAP

Hinsichtlich des Eiweißes konnte der Befund von DUNCAN, MANNERS und ROSS (1956) bestätigt werden, wonach bei Verwendung von 0,25%iger Na_2CO_3-Lösung die größten Proteinmengen extrahiert werden. Die Eiweißwerte stehen jedoch nicht im gleichen Verhältnis zur Aktivität; denn pro ml Extrakt liegen die Aktivitätswerte (A) von Triäthanolaminpuffer, Phosphat und Carbonat in der gleichen Größenordnung, obwohl in diesen drei Medien die Proteinwerte unterschiedlich sind. Diäthanolaminpuffer gibt dagegen den dreifachen Aktivitätswert. Auch auf Protein bezogen wird hier die optimale Ausbeute erreicht. *Somit kann die Extraktion der Transaminasen in Diäthanolaminpuffer als optimal angesehen werden.*

Zur Beantwortung der Frage, ob die niedrigen $Q_{Ferment}$-Werte bei Na_2CO_3 und Phosphat auf eine Inhibierung oder Inaktivierung des Fermentes zurückzuführen sind, wurden Teste des entsprechenden Extraktes in verschiedenen Puffern durchgeführt (Tabelle 3).

Tabelle 3. *Einfluß des Puffers auf die Aktivität der Glutamat-Aspartat-Transaminase*

Extraktionspuffer	A	Testpuffer
a) 0,25% Na_2CO_3 p_H 10,2	$4{,}76 \times 10^{-5}$	Triäthanolaminpuffer
	$2{,}47 \times 10^{-5}$	Na_2CO_3
b) 0,2 mol Phosphatpuffer p_H 7,4 .	$4{,}77 \times 10^{-5}$	Diäthanolaminpuffer
	$4{,}06 \times 10^{-5}$	Triäthanolaminpuffer
	$3{,}35 \times 10^{-5}$	Phosphatpuffer

Im Carbonatextrakt wird, verglichen mit Test in Triäthanolaminpuffer, eine Aktivitätsverminderung um 50% beobachtet, wenn die Messung im Carbonatmilieu erfolgt. Auch der Phosphatextrakt zeigt

unterschiedliche Aktivitätswerte bei der Messung in Diäthanolamin-, Triäthanolamin- und Phosphatpuffer. Im Vergleich mit Test in Diäthanolaminpuffer wird bei der Messung in Phosphatpuffer eine Hemmung um 30% beobachtet. Hinsichtlich des Einflusses von Phosphat konnte kürzlich an gereinigten Präparaten der Glutamat-Aspartat-Transaminase aus Bierhefe gezeigt werden, daß diese Hemmung auf eine Konkurrenzreaktion von Phosphat und Pyridoxalphosphat um das Ferment zurückzuführen ist (HOLZER und JACOBI, unveröffentlichte Versuche). MEISTER (1954) und METZLER (1954) nehmen weiterhin an, daß die Bindung des Cofermentes zum Ferment über die Phosphatgruppe von Pyridoxalphosphat erfolgt. Während nach diesen Ergebnissen die Aktivitätsverminderung bei der Extraktion in Phosphatpuffer auf eine Inhibierung zurückzuführen ist, wird in dem stark alkalischen Milieu der Carbonatlösung mit einem p_H von 10,2 das Ferment wahrscheinlich zum Teil inaktiviert.

Tabelle 4. *Vergleich von Glutamat-Aspartat- und Glutamat-Alanin-Transaminase in Ulva lactuca*

Transaminase	A	$Q_{Ferment}$
Glutamat-Aspartat .	$1{,}31 \times 10^{-4}$	$4{,}75 \times 10^{-2}$
Glutamat-Alanin . .	$2{,}05 \times 10^{-5}$	$1{,}39 \times 10^{-3}$

Hinsichtlich der Stabilität des Fermentes in den Rohpräparaten wurde festgestellt, daß die Aktivität schnell abnimmt. Nach drei Tagen wird nur noch 30% der Aktivität unter den gleichen Testbedingungen gemessen. Bei der Dialyse gegen verdünnten Puffer über 20 Stunden wird sogar eine Aktivitätsabnahme um 80% gemessen. Hinsichtlich der Stabilitätsverhältnisse kamen COHEN und CAMMARATA (1950) an gereinigten Präparaten zu dem gleichen Ergebnis. Die Aktivität der von uns dargestellten Extrakte wurde deshalb noch am gleichen Tag der Herstellung ausgetestet.

Nach diesen Ergebnissen wurden unter den optimalen Bedingungen, d. h. Extraktion und Austestung in 0,2 mol Diäthanolaminpuffer p_H 8,4, vergleichende Messungen an der Glutamat-Aspartat- und an der Glutamat-Alanin-Transaminase durchgeführt. In Tabelle 4 sind, entsprechend den obigen Angaben, die Resultate zusammengestellt, aus denen sich das Verhältnis mit 34:1 zugunsten der ersteren ergibt.

Weiterhin wurde versucht, die Rückreaktion, unter Einsetzung von Glutaminsäure-Dehydrogenase als Hilfsferment, zu testen. Bei der Glutamat-Alanin-Transaminase wurde nach der Reaktion

$$\text{Glutaminsäure} + \text{Brenztraubensäure} \rightleftharpoons \alpha\text{-Ketoglutarsäure} + \text{Alanin}$$

die gebildete α-Ketoglutarsäure mittels Glutaminsäure-Dehydrogenase weiter zu Glutaminsäure reduktiv aminiert:

$$\alpha\text{-Ketoglutarsäure} + NH_4^+ + \text{DPNH} \rightleftharpoons \text{Glutaminsäure} + \text{DPN}^+.$$

Die wegen der Substratsättigung in diesem Ansatz vorhandene große Glutaminsäurekonzentration hat auf die Geschwindigkeit der Folge-

reaktion keinen Einfluß. Bei der Bestimmung der Glutamat-Aspartat Transaminase wurde an Stelle von Brenztraubensäure Oxalessigsäure eingesetzt.

Die unter diesen Bedingungen getestete Aktivität ist für beide Fermente wesentiich geringer als unter Einsatz von Äpfelsäure-Dehydrogenase bzw. Milchsäure-Dehydrogenase (Glutamat-Aspartat-Transaminase 50% und Glutamat-Alanin-Transaminase 80% Verminderung). Die Maximalgeschwindigkeit wird unter diesen Bedingungen erst nach einer Induktionszeit von 30 Minuten erreicht.

b) Aminosäure-Dehydrogenasen.

Neben der Transaminierung ist in der Zelle durch die reduktive Aminierung eine weitere Möglichkeit gegeben, aus α-Ketosäuren eine Synthese von Aminosäuren durchzuführen. Dieser Prozeß, der reversibel ist, gibt weiterhin die Möglichkeit, Aminosäuren oxydativ abzubauen:

$$\alpha\text{-Ketosäure} + NH_4^+ + DPNH\,(TPNH) \rightleftharpoons \alpha\text{-Aminosäure} + DPN^+\,(TPN).$$

Bisher wurde jedoch fast ausschließlich die reduktive Aminierung der α-Ketoglutarsäure zu Glutaminsäure mittels DPNH beschrieben. Lediglich Kritzmann (1947) machte eine Angabe über die Aminierung der Oxalessigsäure zu Asparaginsäure in Rattenleberschnitten; durch Zufuhr von Dicarbonsäuren bzw. Pyruvat und Bicarbonat wurde unter Zusatz von Ammonium ein Anstieg der Asparaginsäurekonzentration beobachtet. Das entsprechende Ferment ist allerdings noch nicht nachgewiesen worden.

In höheren Pflanzen ist die Glutaminsäure-Dehydrogenase wiederholt bestimmt und kürzlich von Bulen (1956) aus Maisblättern isoliert und charakterisiert worden; das Ferment ist DPN-spezifisch und reagiert nicht mit TPN. Mit der Thunberg-Technik hat Watanabe (1947) das gleiche Ferment in *Ulva lactuca* nachgewiesen.

Die Möglichkeit, Aminosäure-Dehydrogenasen mittels des optischen Testes zu messen, ergibt sich aus der mit der Aminierung der Ketosäuren gekoppelten Reduktion der Pyridinnucleotide. Die Aktivität der Glutaminsäure-Dehydrogenase konnte unter Einsatz geeigneter Extraktmengen direkt gemessen werden, da unter den Testbedingungen α-Ketoglutarsäure durch keine weitere Reaktion umgesetzt wird, die mit der Reduktion der Pyridinnucleotide gekoppelt ist. Da das Gleichgewicht weitgehend auf Seiten der Glutaminsäure liegt, sind die günstigsten Meßbedingungen die der reduktiven Aminierung — d. h. Reaktionsstart mit α-Ketoglutarsäure und Messung der Extinktionsabnahme der reduzierten Pyridinnucleotide.

Dagegen überlagern sich bei der Messung der Asparaginsäure-Dehydrogenase unter Einsatz von Oxalessigsäure und DPNH die Reaktionen der Äpfelsäure-Dehydrogenase und der Aminosäure-

Dehydrogenase. Die Äpfelsäure-Dehydrogenase besitzt ein p_H-Optimum bei p_H 9,6 und zeigt bei p_H 7,4 nur noch 20—30% des dort gemessenen Umsatzes. Obwohl die in die Blindreaktion eingehende Aktivität dieses Fermentes durch p_H-Verschiebung zum Sauren hin reduziert werden kann, ist bei p_H 7,4 die Aktivität der Äpfelsäure-Dehydrogenase noch wesentlich aktiver als die der Asparaginsäure-Dehydrogenase. Die Extraktmenge kann, wegen der Summierung beider Reaktionen, nicht beliebig gesteigert werden. Trotzdem wurde in einem bestimmten Bereich eine Proportionalität für die Asparaginsäure-Dehydrogenase gemessen. Beim Test wurde, nach Ablesung der Blindreaktion, mit NH_4^+ (0,04 ml 4 mol $(NH_4)_2SO_4$-Lösung pro Küvette) gestartet. Die Zunahme der Geschwindigkeit erfolgte sofort. Die Differenz dieser Werte und die der Blindreaktion ergibt die Aktivität der Asparaginsäure-Dehydrogenase. Wesentlich einfacher gestaltet sich die Messung und Auswertung der mittels TPNH ablaufenden Reaktion, da die Äpfelsäure-Dehydrogenase mit diesem Coferment nicht aktiv ist.

Wie für die Transaminasen, so wurden auch für die Aminosäure-Dehydrogenasen die optimalen Extraktionsbedingungen studiert. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse für die Glutaminsäure-Dehydrogenase zusammengestellt. Es wurde hier nur das mit DPNH reagierende Ferment getestet. Die Angaben hinsichtlich der Aktivität und der $Q_{Ferment}$-F-Werte entsprechen denen der Transaminasen.

Betrachtet man zunächst die Ausbeute des Fermentes an Hand der Aktivitätswerte, so ergeben sich die günstigsten Bedingungen bei Verwendung von Phosphat- und Diäthanolaminpuffer. Auf die Gesamtmenge an Protein bezogen, liegt wegen des geringeren Eiweißgehaltes der Wert für Triäthanolaminpuffer höher als bei denen der übrigen Puffer.

Tabelle 5. *Extraktion der Glutaminsäure-Dehydrogenase mit verschiedenen Puffern aus Ulva lactuca*

Extraktionspuffer	mg Protein/ml	A	$Q_{Ferment}$
0,2 mol Phosphatpuffer p_H 7,4	2,85	$1{,}31 \times 10^{-6}$	$4{,}60 \times 10^{-4}$
0,2 mol Triäthanolaminpuffer p_H 7,4 . .	1,05	$6{,}98 \times 10^{-7}$	$6{,}63 \times 10^{-4}$
0,2 mol Diäthanolaminpuffer p_H 8,4 . . .	2,58	$1{,}17 \times 10^{-6}$	$4{,}53 \times 10^{-4}$
0,25%ige Na_2CO_3-Lösung p_H 10,2	3,92	$9{,}08 \times 10^{-7}$	$2{,}31 \times 10^{-4}$

In gleicher Weise wurden ebenfalls die Bedingungen für die Asparaginsäure-Dehydrogenase studiert. Die für dieses Ferment erhaltenen Werte sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Proteinwerte sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

Für die Asparaginsäure-Dehydrogenase wird pro ml die größte Aktivität bei Extraktion mit Phosphatpuffer erhalten. Mit Zunahme der Alkalität nimmt die Aktivität dann ab. Wie bei der Glutaminsäure-

Tabelle 6. *Extraktion der Asparaginsäure-Dehydrogenase mit verschiedenen Puffern aus Ulva lactuca*

Extraktionspuffer	A	$Q_{Ferment}$
0,2 mol Phosphatpuffer p_H 7,4 . . .	$4{,}18 \times 10^{-6}$	$1{,}47 \times 10^{-3}$
0,2 mol Triäthanolaminpuffer p_H 7,4 .	$2{,}79 \times 10^{-6}$	$2{,}66 \times 10^{-3}$
0,2 mol Diäthanolaminpuffer p_H 8,4 .	$1{,}48 \times 10^{-6}$	$5{,}47 \times 10^{-4}$
0,25%ige Na_2CO_3-Lösung p_H 10,2 . .	$6{,}98 \times 10^{-7}$	$1{,}78 \times 10^{-4}$

Dehydrogenase, so wird auch hier auf Protein bezogen der größte Wert bei Verwendung von Triäthanolaminpuffer erhalten.

Hinsichtlich der Abhängigkeit der Fermentaktivität vom p_H und vom Puffer in dem die Messung erfolgt, konnte nur die Glutaminsäure-Dehydrogenase studiert werden, da wegen der oben geschilderten Schwierigkeiten die Asparaginsäure-Dehydrogenase nur einen Test in nicht zu stark alkalischem Milieu zuläßt. Für die Glutaminsäure-Dehydrogenase wurde eine größere Aktivität in Diäthanolaminpuffer p_H 8,4 als in Triäthanolaminpuffer p_H 7,4 bestimmt; das Verhältnis ist ungefähr 10:8.

Neben den mit DPN reagierenden Fermenten wurden auch diejenigen gemessen, welche TPN-aktiv sind. Um einen Vergleich von sämtlichen Aminosäure-Dehydrogenasen zu gewinnen, wurden in einem Extrakt die Aktivitäten dieser vier Fermente gemessen. Die Extraktion erfolgte in Diäthanolaminpuffer p_H 7,4. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7. *Aminosäure-Dehydrogenasen aus Ulva lactuca*
$Q_{Ferment}$-Werte für die Cofermente DPN und TPN. Testpuffer: Triäthanolamin p_H 7,4

Ferment	DPN	TPN
Asparaginsäure-Dehydrogenase . . .	$6{,}95 \times 10^{-4}$	$2{,}91 \times 10^{-4}$
Glutaminsäure-Dehydrogenase . . .	$5{,}00 \times 10^{-4}$	$1{,}65 \times 10^{-4}$

Hieraus wird ersichtlich, daß die Aminierung der Oxalessigsäure etwas stärker als die der α-Ketoglutarsäure erfolgt. Die Aktivität der mit DPN-reagierenden Fermente ist um das 2,5—3fache größer als die der mit TPN-reagierenden. Ein entsprechender Test mit Brenztraubensäure und α-Ketobuttersäure blieb negativ. so daß anzunehmen ist, daß die hier ausgetesteten Aminosäure-Dehydrogenasen eine zentrale Stellung im Aminosäure-Stoffwechsel von *Ulva lactuca* einnehmen.

IV. Diskussion

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse der Extraktion, so wird bei Gegenüberstellung von Transaminasen und Aminosäure-

Dehydrogenasen deutlich, daß verschiedene Bedingungen erforderlich sind, um eine optimale Ausbeute zu erhalten. Für die Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in *Ulva lactuca* wurde bereits nachgewiesen, daß, verglichen mit Triäthanolaminpuffer, Phosphatpuffer das geeignetere Extraktionsmittel ist (JACOBI 1957); hinsichtlich der verschiedenen Aufschlußverfahren konnte gezeigt werden, daß das Homogenisieren im Potter-Elvehjem-Apparat zu den größten Aktivitätswerten im Überstand des zentrifugierten Extraktes führt. In der vorliegenden Mitteilung wird unter Anwendung mehrerer Puffer gezeigt, daß das Extraktionsmittel variiert werden muß, um maximale Aktivitätswerte von den hier nachgewiesenen Fermenten zu erhalten. Dabei ist es nicht allein von Bedeutung, möglichst große Proteinmengen zu extrahieren, wie es aus den bei Verwendung von 0,25%iger Carbonatlösung erhaltenen Werten ersichtlich wird, da mit dem Puffer gleichzeitig aktivitätshemmende Faktoren in den Versuchsansatz gelangen (Tabelle 3). Andererseits bedingt ein Mittel mit zu geringer Löslichkeit ebenfalls einen Aktivitätsverlust, wie es unter den verwendeten Puffern für Triäthanolaminpuffer gefunden wurde. Somit müssen also zwei Faktoren berücksichtigt werden: einmal die Löslichkeit des spezifischen Fermentproteins in dem betreffenden Puffer und zum anderen der Einfluß des Puffers auf die Aktivität des Enzyms. Der Einfluß aktivierender und hemmender Faktoren auf die Aktivität ist durch das Studium an isolierten Fermentpräparaten für viele Enzyme hinreichend bekannt (MCELROY und NASON 1954); dagegen bietet die Extraktion noch große Schwierigkeiten, zumal die Wahl des Puffers empirisch ausgetestet werden muß. Diese Frage ist aber für physiologische Untersuchungen bedeutsam, in denen eine Aktivitätsänderung Aussagen über biologische Zustände machen soll. Durch den Vergleich der Aktivitäten von Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen wird aufgezeigt, daß die Bestimmung von mehreren Fermenten in *einem* Extrakt bei Verwendung *eines* Puffers in vielen Fällen nicht möglich ist, sofern die maximale Ausbeute gefordert wird.

Es kann z. Z. noch nicht übersehen werden, ob diese Bedingungen von Objekt zu Objekt variiert werden müssen. Nach den Untersuchungen von SMITH und YOUNG (1955) sind die prozentualen Anteilsverhältnisse der in den Eiweißen gebundenen Aminosäuren in Grün-, Rot- und Braunalgen verschieden. Während z. B. bei *Fucus vesiculosus* und *Ascophyllum nodosum* Glutaminsäure vorherrscht, liegt in *Ulva lactuca* und *Rhodymenia palmata* die basische Aminosäure Arginin maximal vor. Es ist jedoch anzunehmen, daß sich die einzelnen Enzymproteine in ihrer Zusammensetzung nicht zu sehr unterscheiden, obwohl in den letzten Jahren bekannt wurde, daß z. B. die Alkohol-Dehydrogenase

aus Hefe und Leber andere Eigenschaften aufweist. Für die aus tierischen Geweben verschiedener Organismen angereicherten gleichen Fermente wurden jedoch stets die gleichen Eigenschaften erhalten.

Versucht man aus den obigen Ergebnissen über den Nachweis der verschiedenen Fermente einige Gesichtspunkte über den Ablauf des Aminosäure-Stoffwechsels in *Ulva lactuca* abzuleiten, so kann angenommen werden, daß ein ähnlicher Mechanismus vorliegt, wie er bereits von Euler und Mitarb. (1938) vorgeschlagen wurde. Die Glutaminsäure-Dehydrogenase, welche ursprünglich als Ferment des Aminosäureabbaues interpretiert wurde (Krebs 1933, 1935), besitzt nach den Ergebnissen von Euler eine Gleichgewichtskonstante, die weitgehend auf Seiten der Glutaminsäure — also in Richtung der Aminosäuresynthese — liegt. Der bereits damals ausgesprochene Gedanke, daß durch die Transaminierung eine Möglichkeit eröffnet wird, aus der gebildeten Glutaminsäure sämtliche anderen Aminosäuren aufzubauen, ist nach den Ergebnissen von Meister und Cohen für bestimmte Bakterien sowie für tierische Gewebe bewiesen worden. Da Wilson, King und Burris (1954) die große Variationsbreite der Umaminierungsfähigkeit von Glutaminsäure für höhere Pflanzen und mit den vorliegenden Ergebnissen (Tabelle 1) auch für einen Thallophyten bewiesen wurde, kann also dem System

$$\alpha\text{-Ketoglutarsäure} \rightleftharpoons \text{Glutaminsäure}$$

ganz allgemein eine Schlüsselstellung zugesprochen werden, da über diese Reaktion sowohl Synthese als auch Abbau der Aminosäuren gesteuert wird. Zu Zeiten vermehrter Eiweißsynthese wird durch die NH_3-Fixierung an der Ketosäure das Substrat für die Transaminasen und bei bevorzugtem Abbau das Substrat für die Glutaminsäure-Dehydrogenase angeliefert, das in beiden Fällen die Glutaminsäure ist. Die Richtung des Geschehens wird weitgehend durch die Konzentration der Reaktionspartner bestimmt, welche entweder durch die Eiweißsynthese oder durch die Oxydation der Ketosäure über den Tricarbonsäurecyclus verändert wird. Paech (1934, 1955) fand unter diesem Gesichtspunkt, daß die Eiweißsynthese pflanzlicher Gewebe an die Konzentration von Monosacchariden — d. h. ein bestimmtes Niveau des Kohlenhydratstoffwechsels — gebunden ist.

In Hinsicht auf die Transaminasen konnte diese Auffassung für die höheren Pflanzen von Albaum und Cohen (1943) bestätigt werden, die an Haferkeimlingen zeigten, daß der Proteinsynthese eine Erhöhung der Transaminaseaktivität voraus geht. Für die Aminierung wurde allerdings von Wilson, King und Burris (1954) festgestellt, daß dieser Prozeß, verglichen mit der Transaminierung, in der Gerste stark zurücktritt. Diese sehr schwache reduktive Aminierung läßt vermuten,

daß in diesem Objekt die Überführung des anorganischen Stickstoffes in organische Form auf anderen Reaktionswegen erfolgt. VIRTANEN (1932) konnte in diesem Zusammenhang das Ferment Aspartase nachweisen, welches aus Fumarsäure und NH_4^+ Asparaginsäure bildet. Weitere Möglichkeiten ergeben sich nach VIRTANEN und Mitarb. (Zusammenfassung s. VIRTANEN 1955) im Rahmen der Nitratreduktion durch die Oximbildung von Hydroxylamin mit verschiedenen Ketosäuren und weitere Umwandlung zu den entsprechenden Aminosäuren. Nach SILVER und MCELROY (1954) wird in einer Glutaminsäure-Dehydrogenase-freien *Neurospora*-Mutante Pyridoxalphosphat in die Nitratreduktion einbezogen; das aus Hydroxylamin und Pyridoxalphosphat gebildete Pyridoxaloximphosphat geht in Pyridoxaminphosphat über, welches dann für die Transaminierungen zur Verfügung steht.

Der Aminosäureabbau scheint jedoch ein komplexerer Vorgang zu sein, zumal nach ROGERS (1955) in Homogenaten von Maisblättern unter aeroben Bedingungen eine große Zahl von Aminosäuren decarboxyliert wird. Hierbei ist nach den Ergebnissen dieses Autors anzunehmen, daß die oxydative Desaminierung die limitierende Stufe des Vorganges

$$\text{l-Aminosäure} \xrightarrow[-NH_3]{^1/_2\,O_2} \alpha\text{-Ketosäure} \xrightarrow{-CO_2} \text{Fettsäure}$$

ist (s. a. WEBSTER 1955). Unter anaeroben Bedingungen wird in größerem Maße nur Glutaminsäure decarboxyliert. Hier wurde bereits ein Hinweis dafür gegeben, daß der Gesamtprozeß im Sinne einer Fermentkette aufzufassen ist, wobei die Folgereaktion die Richtung und Geschwindigkeit des Einzelprozesses bestimmt. Die von WILSON, KING und BURRIS (1954) aufgezeigte schwache reduktive Aminierung läßt daher nicht den Schluß zu, daß es sich um eine Reaktion von untergeordneter Bedeutung handelt.

Durch die Aktivitätsbestimmung von Aminosäure-Dehydrogenasen konnte für *Ulva lactuca* nun gezeigt werden, daß die reduktive Aminierung ein Prozeß ist, durch den eine meßbare Aminosäuresynthese erfolgt. Die Aktivitätswerte der Glutaminsäure-Dehydrogenase und der Asparaginsäure-Dehydrogenase liegen in der gleichen Größenordnung wie die der Glutamat-Alanin-Transaminase. Für bestimmte Fermente des Kohlenhydratstoffwechsels, z. B. Fructosediphosphat-Aldolase, wurden ähnliche Aktivitätswerte am gleichen Organismus gemessen (JACOBI 1957). Wie in tierischen Geweben, so hat auch hier die Glutamat-Aspartat-Transaminase eine wesentlich höhere Aktivität.

Neben der Aminierung der α-Ketoglutarsäure konnte für *Ulva* ferner die direkte Synthese von Asparaginsäure aus Oxalessigsäure bewiesen werden. Somit kann angenommen werden, daß Synthese und Abbauweg

im Sinne der von EULER entwickelten Vorstellung nicht allein über Glutaminsäure, sondern auch über Asparaginsäure erfolgt. Das hier nachgewiesene Ferment tritt neben die von VIRTANEN entdeckte Aspartase als eine weitere Möglichkeit der Asparaginsäuresynthese in der belebten Natur. In Abb. 1 ist auf Grund der nachgewiesenen Enzyme der Mechanismus des Aminosäure-Stoffwechsels für *Ulva lactuca* schematisch dargestellt.

Hinsichtlich der Konzentration an gebundenen Aminosäuren wurde von SMITH und YOUNG (1955) für *Ulva lactuca* 7,8% Asparaginsäure, jedoch nur 6,8% Glutaminsäure bestimmt. Dieses Verhältnis ist dagegen

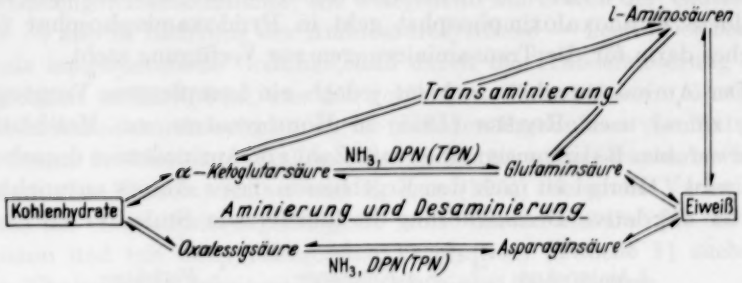


Abb. 1. Mechanismus des Aminosäure-Stoffwechsels in *Ulva lactuca*

in Braunalgen stark zugunsten der Glutaminsäure verschoben (*Fucus vesiculosus:* Glutaminsäure = 11,0%; Asparaginsäure = 6,2%). Es muß daran gedacht werden, daß die Asparaginsäure-Dehydrogenase den erhöhten Bedarf an Asparaginsäure bei der Eiweißsynthese bzw. die vermehrte Anlieferung beim Abbau in diesem Organismus in geeigneter Weise steuert. Die Verarbeitung der gebildeten Asparaginsäure scheint relativ schnell zu erfolgen, da in einer von uns durchgeführten papierchromatographischen Analyse über das Vorkommen von freien Aminosäuren in *Ulva lactuca* diese Aminosäure nur in relativ geringen Konzentrationen vorliegt; mengenmäßig überwiegen Prolin, Glutaminsäure, Glutamin und Alanin, gefolgt von Asparagin, Cystin-Cystein, Glycin und Threonin sowie kleinen Konzentrationen an Asparaginsäure und Methionin. In diesem Zusammenhang wäre die kinetische Untersuchung von KRITZMANN (1947) an Rattenleberschnitten zu nennen, daß nämlich die bei der Aminierung der Oxalessigsäure gebildete Asparaginsäure relativ schnell verschwindet, während die Alaninkonzentration ansteigt. Die in *Ulva* nachgewiesene große Konzentration an Glutaminsäure sowie die des aus ihr gebildeten Prolins ist bedeutsam für die Mannigfaltigkeit der Transaminierungsreaktionen, wie sie in Tabelle 1 wiedergegeben sind.

Unklar bleibt noch die Funktion der Spezifität der Cofermente für die reduktive Aminierung. In Hefen ist die Glutaminsäure-Dehydrogenase spezifisch auf TPN eingestellt (von EULER und Mitarb. 1938). Inwieweit in *Ulva* andere Aminosäuren aus ihren entsprechenden Ketosäuren gebildet werden können, läßt sich z. Z. noch nicht sagen. Das Ausbleiben der reduktiven Aminierung von Brenztraubensäure und α-Ketobuttersäure mittels der Pyridin-Nucleotide bringt noch keinen Beweis für das Fehlen der NH_3-Fixierung an diese Ketosäuren, zumal WARBURG und CHRISTIAN (1938) für die Alanin-Dehydrogenase als Coferment Flavin-Adenin-Nucleotid erkannt haben. Dieses Ferment ist jedoch spezifisch auf den Umsatz der unnatürlichen d-Aminosäuren eingestellt.

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Forschungsstipendiums der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die uns in einer Sachbeihilfe auch die hochtourige Zentrifuge („Eispirouette") sowie das Photometer „Eppendorf" zur Verfügung stellte. durchgeführt. Es sei mir gestattet, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die gewährte Unterstützung meinen Dank zu sagen.

Zusammenfassung

1. In zellfreien Extrakten von *Ulva lactuca* wurde papierchromatographisch die Transaminierung von 15 Aminosäuren mit α-Ketoglutarsäure und von 10 Aminosäuren mit Brenztraubensäure nachgewiesen.

2. Bei der Extraktion und Messung der Glutamat-Aspartat-Transaminase in verschiedenen Puffern wurde eine Inhibitorwirkung von Phosphatpuffer und 0,25%iger Carbonatlösung beobachtet. Die optimalen Bedingungen wurden im Diäthanolaminpuffer gemessen.

3. Die Aktivitäten von Glutamat-Aspartat- und Glutamat-Alanin-Transaminase stehen zueinander im Verhältnis 34:1.

4. Eine enzymatisch katalysierte reduktive Aminierung wurde sowohl für α-Ketoglutarsäure wie auch für Asparaginsäure gemessen.

5. Glutaminsäure-Dehydrogenase und Asparaginsäure-Dehydrogenase reagieren sowohl mit DPN wie mit TPN. Die Aktivität ist mit DPN ungefähr dreimal so groß.

5. Die Ergebnisse werden hinsichtlich des Aminosäurestoffwechsels in *Ulva lactuca* diskutiert.

Literatur

ADLER, E., G. GÜNTHER u. J. E. EVERETT: Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. Z. physiol. Chem. **255**, 27 (1938). — ADLER, E., N. B. DAS, H. v. EULER u. U. HEYMAN: Biologische Dehydrierung und Synthese der Glutaminsäure. C. r. Trav. Labor. Carlsberg. Sér. chim. **22**, 15 (1938). — ALBAUM, H. G., and P. P. COHEN: Transamination and protein synthesis in ger-

minating oat seedlings. J. of Biol. Chem. **149**, 19 (1943). — BULEN, W. A.: The isolation and characterisation of glutamic acid dehydrogenase from corn leaves. Arch. of Biochem. a. Biophysics **62**, 173 (1956). — CAMMARATA, P. S., and P. P. COHEN: The scope of the transamination in animal tissues. J. of Biol. Chem. **187**, 439 (1950). — CHANNING, D. M., and G. T. YOUNG: Amino acids and peptides. Part X. The nitrogenous constituents of some marine algae. J. Chem. Soc. (Lond.) **1953**, 2481. — DUNCAN, W. A. M., D. I. MANNERS and A. G. ROSS: Enzyme systems in marine algae. The carbohydrase activities of unfractionated extracts of Cladophora rupestris, Laminaria digitata, Rhodymenia palmata and Ulva lactuca. Biochemic. J. **63**, 44 (1956). — ERICSON, L. E., u. A. G. M. SJÖSTRÖM: Aminosäuren in Meeresalgen. Acta chem. scand. (Copenh.) **6**, 805 (1952). — EULER, H. v., E. ADLER, G. GÜNTHER u. N. B. DAS: Über den enzymatischen Abbau und Aufbau der Glutaminsäure. II. In tierischen Geweben. Z. physiol. Chem. **254**, 61 (1938). — JACOBI, G.: Vergleichende Untersuchungen über den Stickstoffumsatz bei der Rezeptakelbildung bei Fucus vesiculosus. Kiel. Meeresforsch. **12**, 65 (1956). — Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in Extrakten von Ulva lactuca. Planta (Berl.) **49**, 1 (1957). — Fermente des Aminosäure-Stoffwechsels in Ulva lactuca. Naturwiss. **44**, 265 (1957). — KREBS, H. A.: Untersuchungen über den Stoffwechsel der Aminosäuren im Tierkörper. Z. physiol. Chem. **217**, 191 (1933). — Weitere Untersuchungen über den Abbau der Aminosäuren im Tierkörper. Z. physiol. Chem. **218**, 157 (1933). — Metabolism of amino acids. III. Deamination of amino acids. Biochemic. J. **29**, 1620 (1935). — KRITZMANN, M. G.: The mechanism of formation of amino acids in surviving animal tissues from pyruvate and ammonia. J. of Biol. Chem. **167**, 77 (1947). — MCELROY, W. D., and A. NASON: Mechanism of action of micronutrient elements in enzyme systems. Annual Rev. Plant Physiol. **5**, 1 (1954). — MEISTER, A.: Enzymatic transfer of alpha- amino groups. Science (Lancaster, Pa.) **120**, 43 (1954). — Transamination. Adv. Enzymol. **16**, 185 (1955). — MEISTER, A., H. A. SOBER and E. A. PETERSON: Activation of purified glutamic-aspartic-apotransaminase by crystalline pyridoxamine phosphate. J. Amer. Chem. Soc. **74**, 2385 (1952). — Studies on the coenzyme activation of glutamic-aspartic-apotransaminase. J. of Biol. Chem. **206**, 89 (1954). — METZLER, D. E., M. IKAWARA and E. E. SNELL: A general mechanism for vitamine B_6-catalyzed reactions. J. Amer. Chem. Soc. **76**, 648 (1954). — MILLBANK, J. W.: Demonstration of transaminase systems in the algae Chlorella. Nature (Lond.) **171**, 476 (1953). — OCHOA, S.: Malic dehydrogenase from pig heart. Methods in Enzymology, Vol. I, p. 735. New York: Academic Press 1955. — O'KANE, D. E., and J. C. GUNSALUS: The resolution and purification of glutamic-aspartic transaminase. J. of Biol. Chem. **170**, 425 (1947). — PAECH, K.: Zur natürlichen Regulation des Eiweißstoffwechsels in Pflanzen. Planta (Berl.) **22**, 794 (1934). — Über die Regulation des Eiweißumsatzes und über den Zustand der proteolytischen Fermente in den Pflanzen. Planta (Berl.) **24**, 78 (1935). — PFLEIDERER, G., W. GRUBER u. TH. WIELAND: Eine enzymatische Bestimmung der l-Asparaginsäure. Biochem. Z. **326**, 446 (1955). — ROGERS, B. J.: Oxidation and decarboxylation of amino acids by squash preparations. Plant Physiol. **30**, 186 (1955). — SILVER, W. S., and W. D. MCELROY: Enzyme studies on nitrate and nitrite mutants of Neurospora. Arch. of Biochem. a. Biophysics **51**, 379 (1954). — SMITH, D. G., and E. G. YOUNG: On the nitrogenous constituents of Fucus vesiculosus. J. of Biol. Chem. **205**, 849 (1953). — The combined amino acids in several species of marine algae. J. of Biol. Chem. **217**, 845 (1955). — STEINBERG, D., and B. H. OSTROW: Serum transaminase as a measure of myocardial necrosis. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **90**, 31 (1955). — STRAUB, F. B.:

Reinigung der Äpfelsäure-Dehydrogenase und die Bedeutung der Zellstruktur in der Äpfelsäuredehydrierung. Z. physiol. Chem. **275**, 63 (1942). — TAKAGI, M.: Chemical studies on seaweeds. II. The amino acids of Ulva pertusa, Enteromorpha Linza and Enteromorpha Linza var. crispata. Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ. **1**, 77 (1951). — VIRTANEN, A., u. J. TARNANEN: Die enzymatische Spaltung und Synthese der Asparaginsäure. Biochem. Z. **250**, 193 (1932). — VIRTANEN, A.: Neue Amino- und Ketosäuren in grünen Pflanzen und die Biosynthese der Aminosäuren. Angew. Chem. **67**, 381 (1955). — WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten. (Pyridin-Nucleotide.) Biochem. Z. **287**, 291 (1936). — Isolierung der prosthetischen Gruppe der d-Aminosäureoxydase. Biochem. Z. **298**, 150 (1938). — WATANABE, A.: Über die Dehydrasen von Meeresalgen. IV. Acta Phytochim. (Tokyo) **15**, 129 (1947). — WEBSTER, G. C.: Nitrogen metabolism. Annual. Rev. Plant Physiol. **6**, 43 (1955). — WILSON, D. G., K. W. KING and R. H. BURRIS: Transamination reactions in plants. J. of Biol. Chem. **208**, 863 (1954).

Dr. GÜNTER JACOBI, Institut für Meereskunde der Univ. Kiel, Hohenbergstr. 2

Planta, Bd. 49, S. 578—587 (1957)

Aus dem Staatsinstitut für allgemeine Botanik und Botanischer Garten Hamburg

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DES ABSCHUSSRHYTHMUS UND DES FARBSTOFFS VON SPHAEROBOLUS STELLATUS (THODE) PERS.

Von

INGEBORG FRIEDERICHSEN und HORST ENGEL

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Mai 1957)

Einleitung

Ende Oktober 1955 fanden wir im Sachsenwald bei Hamburg die stecknadelkopfgroßen Fruchtkörper des Gastromyceten *Sphaerobolus stellatus*. Die gelborangefarbigen Gebilde wuchsen auf morschem Holz zwischen altem Sägemehl. Was uns an dem Pilz sogleich auffiel, war sein Farbstoff. Zwar hatte schon BULLER (1933) in ihm ein Carotinoid vermutet und den Gedanken ausgesprochen, daß zwischen diesem, der Lichtperzeption und der Abschußtätigkeit des Pilzes ein Zusammenhang bestehen müsse. Seit langem war schon bekannt, daß die Gleba nur im Licht abgeschossen wird. BULLER stellte jedoch keine Untersuchungen an, um seine Vermutungen auf ihre Richtigkeit zu prüfen. Nach BÜNNING (1937/38, 1954) spielt das Carotin in den Sporangienträgern von Pilobolus die Rolle eines Sensibilisators und leitet damit jene Reaktionen ein, die zur phototropischen Krümmung des Trägers und zum Abschuß des Sporangiums führen. Es lag nahe, einen solchen Zusammenhang auch bei *Sphaerobolus* zu vermuten. Allerdings war von vornherein anzunehmen, daß wegen des komplizierten anatomischen Baues der Fruchtkörper die Verhältnisse bei diesem hochstehenden Pilz wesentlich verwickelter sein würden. Unsere bisherigen Untersuchungen haben ergeben, daß der Farbstoff in der Tat ein Carotinoid ist. Es bildet sich im jungen Mycel nur nach Belichtung und wandert sodann in die reifenden Fruchtkörper. Über diesen Teil unserer Untersuchungen soll im folgenden berichtet werden.

Reinzucht und Kulturmethoden

Wir brachten die frischen Fruchtkörper samt ihrer natürlichen Unterlage unter eine Glasglocke und hatten das Glück, daß noch einige Gleben abgeschossen wurden. Diese wurden mit steriler Nadel von der Glaswand entfernt und auf einen Nähragar gebracht, der nach der Vorschrift von LORENZ (1933) hergestellt war: Biomalz 40 g, Agar 15 g, Aqu. dest. 1000 ml; p_H 6,1—6,4.

Die Agarkulturen wurden im Dunkeln bei 27° C bebrütet, Bedingungen, die nach LORENZ das Mycelwachstum des Pilzes fördern. Da die abgeworfene Gleba

ohne Ruhepause keimt, traten schon am nächsten Tag weiße Hyphen aus ihr heraus, und nach und nach bildeten sich konzentrische Zonen von Mycel. Es bereitete keine Schwierigkeiten, durch Übertragung sauber erscheinender Mycelstücke auf frischen Agar Reinkulturen zu erhalten.

Im Dunkeln bildet das Mycel keine Fruchtkörper (Lorenz 1933, Buller 1933). Da auch wir die Abhängigkeit der Fruchtkörperbildung vom Licht untersuchen wollten, erfolgte die Heranzucht des Pilzes stets bei völliger Dunkelheit im Brutschrank (27° C), und zwar so lange, bis die ganze Agaroberfläche in den Kulturgefäßen vom Mycel bedeckt war. Erst danach kamen die Kulturen in den Versuchsraum des Institutskellers, der eine fast konstante Temperatur von 18—20° C aufwies. Dort wurden sie einem künstlichen 12:12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel ausgesetzt.

Der Farbstoff

Die Identifizierung des Farbstoffs bereitete große Schwierigkeiten, da wegen der geringen Mycelmengen und der Kleinheit der Fruchtkörper stets nur wenig Pilzmaterial zur Verfügung stand. Um zu einigermaßen greifbaren Farbstoffkonzentrationen zu kommen, mußten daher zahlreiche Kulturgefäße angesetzt werden. Aber selbst dann blieb die Ausbeute so gering, daß wir über mehr als nur qualitative Befunde einstweilen nicht hinauskamen.

1. Methodik. Da wir annahmen, daß es sich bei dem Farbstoff von *Sphaerobolus* um Carotinoide handelt, wurde von vornherein die Methodik danach eingerichtet. Wir folgten den Angaben von Karrer und Jucker (1948). Reinigung und Trennung der Farbstoffkomponenten wurden chromatographisch an der Aluminiumoxydsäule versucht, das Absorptionsverhalten mit Hilfe des Zeiß-Opton-Spektralphotometers bestimmt.

Nachdem die Pigmentation im 12:12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel weit genug fortgeschritten war, wurden die Pilzdecken möglichst quantitativ vom Agar entfernt und mehrere Male mit Methanol extrahiert. Es gelang jedoch nicht, auf diese Weise die Fruchtkörper restlos zu entfärben. Aus den vereinigten Methanolextrakten wurde der Farbstoff mit Petroläther ausgeschüttelt. Er ging mit goldgelber Farbe fast vollständig in diesen über. Bei der anschließenden Verseifung mit 12%iger methylalkoholischer KOH blieb er fast ganz im Petroläther. Er verhielt sich wie ein epiphasisches Carotinoid. Die petrolätherische Lösung wurde mehrfach mit H_2O gewaschen, mit Na_2SO_4 getrocknet und unter N_2 und vermindertem Druck eingeengt. Der gelblich-braune amorphe Rückstand wurde mit verschiedenen Lösungsmitteln aufgenommen und auf sein Absorptionsverhalten untersucht.

2. Die Absorptionskurve. Wie die Form der Absorptionskurven und die Lage ihrer Maxima in Abb. 1 erkennen lassen, handelt es sich bei dem gelben Pigment von *Sphaerobolus stellatus* einwandfrei um ein Carotinoid. Die Vermutung Bullers (1933) hat damit eine Bestätigung gefunden. Im Bereiche des sichtbaren Lichtes sind 3 Absorptionsmaxima vorhanden, die in CS_2 bei 521—522, 490—491 (Hauptgipfel) und 464 bis

465 mμ liegen, in Petroläther jeweils um etwa 30—31 mμ in Richtung zum kurzwelligen Bereich verschoben sind. In seinem Absorptionsverhalten kommt das Carotinoid dem β- oder γ-Carotin noch am nächsten, ohne aber mit einem der beiden ganz übereinzustimmen.

Die Verseifung des Rohextraktes hatte auf die Lage der Maxima keinen Einfluß. Auch stimmte der Farbstoff aus dem Mycel in seinem Absorptionsverhalten mit dem aus den Fruchtkörpern überein. Um zu prüfen, ob der Rohextrakt verschiedene Carotinoide enthielt, ließen wir ihn durch eine Säule aus Aluminiumoxyd (standardisiert, Merck Nr. 1097) laufen, z. T. unter Verdrängung der Luft durch N_2. Hierbei hatten wir jedoch beträchtliche Schwierigkeiten insofern, als sich der Farbstoff recht labil verhielt. Es bildeten sich nach langer Laufzeit meistens verschiedene Zonen heraus, aber diese zeigten nach ihrer Eluierung eine stark herabgesetzte Extinktion. Die Absorptionsschwerpunkte des ursprünglichen Farbstoffs waren mehr oder weniger verschwunden. Dafür bildete sich ein neues, sehr steiles, bis zu 100% betragendes Maximum bei 378 mμ (in CS_2) heraus, das schon im Rohextrakt angedeutet war. Diese Verschiebung der Absorption zum UV um etwa 143 mμ, bezogen auf das langwellige Maximum, traf für alle Eluate zu. Sie läßt auf Cis-trans-Umlagerungen schließen. Die Erscheinung konnte jedoch wegen zu geringer Substanzmengen nicht weiter verfolgt werden. Im übrigen machte der Farbstoff jedoch einen einheitlichen Eindruck. Wir müssen allerdings die Möglichkeit offenlassen, daß bei Untersuchung großer Pilzmengen zusätzlich noch das eine oder andere Begleitpigment gefunden wird.

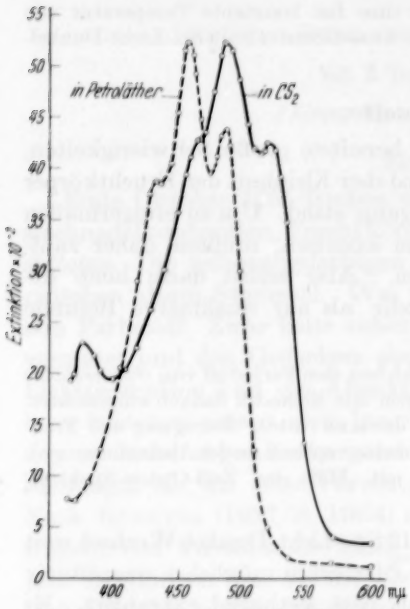


Abb. 1. Absorptionskurve des Pigmentes von *Sphaerobolus stellatus* in Petroläther und CS_2

Der frische, nicht chromatographierte Rohextrakt lieferte stets die gleichen Absorptionskurven, einerlei, welche Pilzernte untersucht wurde und wie alt diese war. Es lag stets derselbe Farbstoff vor, den wir vorläufig Sphaerobolin nennen wollen.

Licht und Farbstoffbildung

1. Methodik. Zu diesen Versuchen dienten die in Tab. 1 erwähnten Farbfilter-Gläser der Firma Schott-Mainz, Größe 9 × 12 cm, Dicke 1 mm. Die Glasplatten

wurden als Fenster in das Dach von Zinkkästen eingesetzt, die 20 cm hoch und je 15 cm breit und tief waren. Jede Kammer erhielt eine Pilzkultur, die in einem 100 ml-Becherglas mit 20 ml Nähragar im Dunkeln herangezogen war. Zum Schutz gegen Austrocknung wurde über das Kulturgefäß ein 400 ml-Becherglas gestülpt, dessen unterer Rand in H_2O tauchte.

Die Kästen wurden unter eine 250 Watt-HPL-Lampe gebracht. Zur Messung der Lichtintensität diente ein AEG-Luxmeter, zur Bestimmung der Lichtenergie das Vakuum-Thermoelement nach Hase mit Quarzfilter in Verbindung mit einem Lichtmarken-Galvanometer von Siemens & Halske. Die Messungen erfolgten nach den Angaben von Nuernbergk (1955).

Zur Bestimmung der Pigmentkonzentration in den Pilzdecken wurden Mycel und Fruchtkörper vom Agar entfernt, an der Luft getrocknet und dann gewogen. Anschließend erfolgte die Extraktion mit Methanol und die Überführung des Farbstoffs in Petroläther. Zur Bestimmung der Extinktion diente das Photometer Eppendorf. Da uns relative Werte genügten, verglichen wir mit einer Lösung von Kaliumbichromat. In jeder der 4 Versuchsserien wurden die in der Trockensubstanz ermittelten Farbstoffmengen auf den jeweils höchsten Farbwert bezogen (Tab. 1). Die Kulturen standen im 12:12 stündigen Licht-Dunkelrhythmus.

Tabelle 1

Filter	Farbe	Lux	$\mu W/cm^2$	Relative Farbstoffmenge in % Versuch Nr.			
				1	2	3	4
UG 1	dunkelviolett	122	173	—	+	17,0	28,3
BG 12	blau	113	415	61,8	100	51,5	57,6
BG 25	blau	123	532	100	80,9	100	44,9
BG 18	blaugrün	3930	1207	—	+	+	100
VG 5	gelblichgrün	4200	991	0	+	+	—
VG 10	grünlichgelb	4830	1405	+	+	15,6	+
GG 14	dunkelgelb	5030	1477	—	+	51,5	—
OG 4	orangegelb	5170	1636	+	+	+	—
OG 5	orange	3880	1299	0	+	0	—
RG 1	hellrot	503	550	0	0	0	0
RG 5	dunkelrot	178	320	0	0	0	0
Kontrolle	weiß	5030	—	39,4	100	50,7	74,1

+ = Farbstoff vorhanden, aber nicht meßbar; 0 = kein Farbstoff erkennbar; — = Filter nicht im Versuch.

2. Das Wirkungsspektrum des Lichtes. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, kam es in allen Versuchen unter den Farbgläsern BG 25, BG 12 und der Kontrolle (weißes Licht) zur Bildung einer gut meßbaren Menge Carotin. Dagegen blieb unter den Farbfiltern RG 1 und RG 5 das Mycel rein weiß. Unter den Filtern UG 1, BG 18, VG 5, VG 10, GG 14, OG 4 und OG 5 erhielten wir unter den gegebenen Bedingungen eine zwar meist erkennbare, aber nicht immer meßbare Farbstoffproduktion. Zur Fruchtkörperbildung kam es nur dort, wo auch Pigmentation vorausgegangen war. Im Rot entstanden somit keine Fruchtkörper.

Aus alledem folgt, daß der Pilz zur Farbstoff- und Fruchtkörperbildung kurzwelliges, und zwar in der Hauptsache blaues bis violettes

Licht braucht. Der wirksame Wellenlängenbereich erstreckt sich von mindestens etwa 365 mμ (untere Grenze der Emission der HPL-Lampe) bis höchstens etwa 600 mμ. Da die Verfärbung des Pilzes unter den Filtern BG 25 und BG 12 am intensivsten war, möchten wir annehmen, daß das günstigste Licht zwischen 365—500 mμ zu suchen ist, einem Wellenbereich, in dem auch der Absorptionsschwerpunkt des Sphaerobolins liegt (etwa 458 mμ in Petroläther). Licht oberhalb etwa 600 mμ war völlig unwirksam und verhielt sich wie Dunkelheit. Nicht ausgeschlossen ist, daß auch noch Licht unterhalb 365 mμ wirksam ist.

Für die Carotin- und Fruchtkörperbildung war der *rhythmische* Licht-Dunkel-Wechsel nicht erforderlich. Pilzkulturen im Dauerlicht färbten sich ebenfalls, und es kam auch zur Anlage sowie zum Abschuß von Fruchtkörpern. Die Zeitspanne für die Bildung des Farbstoffs im Licht-Dunkel-Rhythmus war um so kürzer, je länger die Kulturen vorher im Dunkeln herangezogen wurden. Vermutlich entstehen bereits im Dunkeln gewisse Carotinvorstufen, die sich anhäufen, wenn kein Licht gegeben wird.

Der Abschußrhythmus

1. Methodik. Zu diesen Versuchen wurde der Pilz in Jenaer Bechergläsern, Breitformat 400 ml, mit je 50 ml Agar kultiviert. Die Kulturen blieben so lange im dunklen Brutschrank, bis sich ein dichtes weißes Mycel gebildet hatte. Sodann kamen sie in den Keller unter 2 Osram-Leuchtröhren von je 40 Watt. Die Lichtintensität in Höhe der Pilzdecke betrug etwa 1350 Lux. Der 12:12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel wurde von einer elektrischen Schaltuhr so reguliert, daß die tägliche Lichtperiode von 9—21 h dauerte. Sobald die Fruchtkörper fast reif waren, kam eine Kultur unter die im selben Rhythmus gesteuerte HPL-Lampe (4000—4200 Lux), eine zweite in den natürlichen Tag-Nacht-Wechsel an ein NE-Fenster des Instituts, und eine dritte blieb unter den Leuchtröhren. Da die Versuche im März und April durchgeführt wurden, betrug die Länge der natürlichen Licht- und Dunkelperioden gleichfalls etwa 12 St.

Sobald die Abschußtätigkeit des Pilzes eingesetzt hatte, wurden die am Petrischalen-Deckel und an der Wand des Kulturgefäßes klebenden Gleben täglich gezählt und entfernt. Interessant hierbei war, daß trotz dieser Manipulationen keine Verunreinigungen der Kulturen durch andere Pilze oder Bakterien erkennbar waren. Offenbar scheidet *Sphaerobolus* antibiotisch wirksame Stoffe in das Kulturmedium aus, die andere Organismen niederhalten.

2. Die Abschußtätigkeit. Schon 5—6 Tage nach Übertragung der Kulturen in den Lichtrhythmus begann die Verfärbung des Mycels. Nach 15—17 Tagen waren die ersten Fruchtkörper-Anlagen makroskopisch erkennbar. Je weiter deren Entwicklung fortschritt, desto mehr verschwand der Farbstoff aus dem Mycel, während sich die Fruchtkörper verfärbten. Schließlich waren nur noch diese gefärbt, und das Mycel erschien wieder rein weiß. Offenbar war das Carotin aus den Hyphen in die Fruchtkörper gewandert.

Das Aufreißen der Fruchtkörper und das Abschießen der Gleben erfolgten im 12:12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel gemäß den Angaben älterer

Autoren immer nur während der Lichtperioden, nie in der Dunkelheit. Im natürlichen Tageslicht öffneten sich die Fruchtkörper etwa um 9 h, und 2—3 St. später begann dann die Abschußtätigkeit. Im künstlichen Licht-Dunkel-Wechsel fiel diese etwa in die Zeit der 3.—4. St. nach Einschalten des Lichtes. Welche Lichtart für die tägliche Periodizität verantwortlich ist, können wir noch nicht sagen. Da das Carotin aus dem Mycel in die Fruchtkörper wandert, ist anzunehmen, daß es ebenfalls das blau-violette Licht ist. Unbeantwortet muß auch noch die Frage bleiben, welche Lichtart für die Orientierung der Fruchtkörper zur Einfallsrichtung des Lichtes maßgebend ist.

Tabelle 2

Versuch Nr.	Lichtquelle	Anzucht im Brutschrank Tage	Weiterzucht unter den Leuchtröhren im 12:12St.-Rhythmus Tage	Dauer der Fruchtkörperentwicklung Tage	Dauer der Abschußtätigkeit Tage	Gesamtdauer des Versuchs Tage	Gesamtzahl der abgeschossenen Gleben	Im Durchschnitt pro Tag abgeschossene Gleben
1	Tageslicht	21	83	13	42	159	1176	28,0
	HPL 250			17	38	159	967	25,5
	Leuchtröhren			37	21	162	167	7,6
2	Tageslicht	30	74	11	42	157	999	23,7
	HPL 250			11	52	157	1370	26,3
	Leuchtröhren			39	31	174	505	15,8
3	Tageslicht	19	38	18	48	123	2009	42,0
	HPL 250			21	32	110	1271	39,6
	Leuchtröhren			34	32	123	984	30,7

In Tab. 2 sind die Ergebnisse von 3 Versuchen zusammengestellt. Die Leuchtröhren wirkten am ungünstigsten. Die Ausreifung der Fruchtkörper dauerte länger, und die Zahl der abgeschossenen Gleben war bedeutend geringer als im Tageslicht oder im Licht der HPL-Lampe. Worauf der Unterschied beruhte, ob auf der bedeutend stärkeren Lichtintensität der HPL-Lampe und des Tageslichtes oder auf der verschiedenen qualitativen Zusammensetzung der einzelnen Lichtquellen, muß einstweilen offenbleiben. Die Leuchtröhren haben zwischen 400—600 mμ eine erheblich stärkere Emission als die HPL-Lampe, während diese im langwelligen Teil des Spektrums (620—680 mμ) stärker emittiert.

Wie die Abb. 3 und 4 zeigen, war die Abschußtätigkeit über die gesamte Versuchszeit gesehen nicht gleichmäßig, sondern sie verlief rhythmisch mit ausgeprägten Maxima, die etwa alle 10—14 Tage wiederkehrten. Neben der kurzfristigen täglichen Rhythmik bestand somit noch eine langfristige, deren Perioden mehrere Tage andauerten. Wahr-

scheinlich beruhte diese auf der periodischen Nährstoffverarmung der oberen Agarschichten, aus denen der Pilz seine Nahrungsstoffe nimmt. Jeder Erschöpfungsperiode entsprach vermutlich eine Zeit gesteigerter Fruchtkörperbildung. Die Abschußmaxima wurden im Laufe der Zeit kleiner und unregelmäßiger, sicher eine Folge der totalen Erschöpfung des Nährbodens.

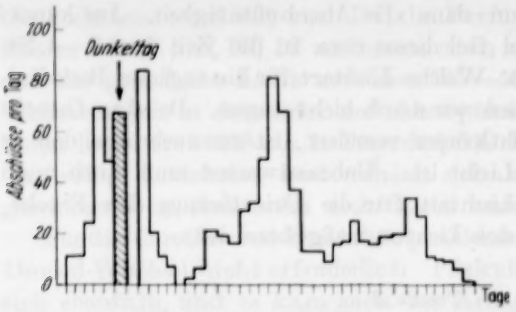


Abb. 2. Langfristiger Abschußrhythmus der Fruchtkörper von *Sphaerobolus stellatus* im 12 : 12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel, HPL-Lampe

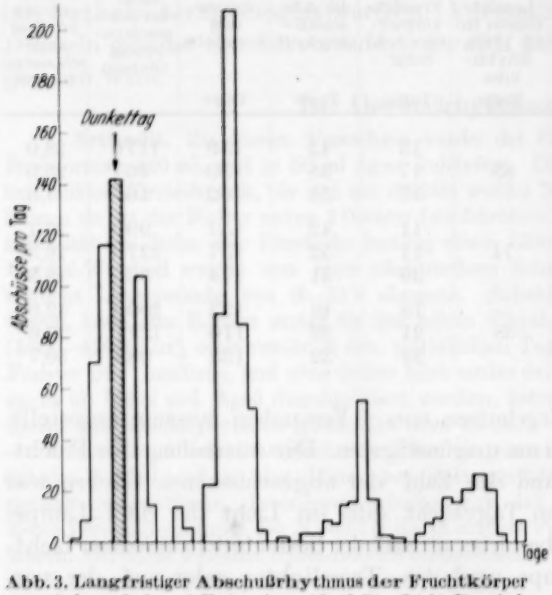


Abb. 3. Langfristiger Abschußrhythmus der Fruchtkörper von *Sphaerobolus stellatus* im 12:12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel, Tageslicht

Wir haben gesehen, daß das Aufreißen der Fruchtkörper und das Abschießen der Gleben im 12 : 12 St.-Licht-Dunkel-Wechsel immer nur während der Lichtperioden erfolgten. Was geschieht nun, wenn dieser Cyclus plötzlich gestört wird, wenn z. B. an Stelle einer Lichtphase Dunkelheit eintritt? Um diese Frage zu prüfen, wurden die Kulturen während einer der Lichtperioden mit einem Dunkelsturz überdeckt, so daß sich der äußere Rhythmus folgendermaßen gestaltete:

— — — 12:12:12:12:12:12:12:12:12 — — — usw.

In den Abb. 3 und 4 ist der nichtplanmäige Dunkeltag schraffiert angedeutet.

Es zeigte sich, daß die Gleben während des eingeschobenen Dunkeltages genauso abgeschossen wurden, als ob es hell wäre. Am darauffolgenden planmäßigen Lichttag fanden dagegen keine Abschüsse mehr statt. Erst in der zweiten normalen Lichtphase nach dem außerplanmäßigen Dunkeltag wurden wieder Gleben abgeschleudert und zwar meistens mit vermehrter Intensität. Wir können aus diesem Verhalten

des Pilzes schließen, daß die Abschlußtätigkeit während einer gegebenen Lichtperiode durch die vorhergehende Lichtperiode induziert wird. Das Licht wird zwar benötigt, um im reifen Fruchtkörper die zum Abschuß führende Reaktionskette auszulösen. Für deren Ablauf ist es jedoch nicht mehr erforderlich. Unter den gegebenen Bedingungen dauerte die Reaktionszeit etwa 24 St.

So ist es erklärlich, daß am ersten auf die unperiodische Verdunkelung folgenden Lichttag die Abschußtätigkeit erlosch, da die tags zuvor reif gewordenen Fruchtkörper kein Licht erhielten, um den komplizierten Öffnungsmechanismus in Bewegung zu setzen. So ist es ferner erklärlich, daß sich am zweiten auf die unperiodische Dunkelphase folgenden Lichttag die Abschußtätigkeit in der Regel steigerte, da zu den normal abschießenden Fruchtkörpern noch jene kamen, die während der nichtplanmäßigen Dunkelperiode blockiert wurden.

Schlußbetrachtungen

Die vorstehenden Untersuchungen haben gezeigt, daß das gelbe Pigment von *Sphaerobolus stellatus* ein Carotinoid ist, dessen Absorptionsverhalten mit keinem der schon bekannten Carotinoide übereinstimmt. Man vergleiche die Zusammenstellungen bei Karrer und Jucker (1948), Haxo (1955) und Goodwin (1955). Ob auch Lactoflavin vorhanden ist und das lichtphysiologische Verhalten des Pilzes bestimmt, haben wir nicht untersucht.

Das ziemlich unbeständige Sphaerobolin bildet sich nur im Licht, und zwar im blau-violetten, nicht im roten. Damit verhält sich Sphaerobolus wie viele andere Pilze, bei denen man Carotinoide nachgewiesen hat. So ist vornehmlich blaues Licht für die Pigmentation von *Neurospora sitophila* (Went 1904, v. Deventer 1930), *N. crassa* (Haxo 1949, Zalokar 1954), *Pyronema confluens* (Carlile und Friend 1956) *Fusarium oxysporum* (Carlile 1956), *Dacrymyces ellisii* (Bulat 1954) u. a. notwendig.

Eine Abhängigkeit der Pigmentation vom Licht scheint jedoch nicht immer vorzuliegen, besonders nicht bei den niederen Pilzen. So bilden *Phycomyces blakesleeanus* (Garton, Goodwin und Lijinsky 1951), *Pilobolus kleinii* (Bünning 1937/38), *Karlingia rosea* (Haskins und Weston jr. 1950) ihr Carotin auch im Dunkeln. Allerdings hat auch bei diesen Pilzen das Licht eine deutlich fördernde Wirkung, und Schopfer (1949) gibt an, daß sich bei *Phycomyces blakesleeanus* das Carotin weder im Dunkeln noch im roten Licht bildet, sondern nur im blau-violetten.

Bei *Sphaerobolus stellatus* folgt auf die Pigmentation stets die Anlage von Fruchtkörpern und der Farbstoff tritt in diese über. Ohne Belichtung bilden sich keine Fruchtkörper. Da diese so angelegt werden, daß der Abschuß der Gleba stets in Richtung der Lichtquelle erfolgt,

spielt das Carotin bei der Ausrichtung der Fruchtkörperanlagen vermutlich eine entscheidende Rolle. Robinson (1926) vermutete bei *Pyronema confluens* eine Beziehung zwischen der Farbstoff- und der Apothecienbildung. Nach den Untersuchungen von Carlile und Friend (1956) am gleichen Objekt und von Carlile (1956) an *Fusarium oxysporum* handelt es sich jedoch um 2 getrennte photochemische Vorgänge. Es besteht die Möglichkeit, daß auch bei *Sphaerobolus* kein Zusammenhang vorliegt, daß also die Pigmentation und die Fruchtkörperbildung bzw. deren Orientierung zum Licht unabhängig voneinander ausgelöst werden, womöglich sogar von verschiedenem Licht.

Das Licht ist bei *Sphaerobolus* darüber hinaus auch für die Abschußtätigkeit verantwortlich. Welche Lichtart hierbei wirksam ist, wissen wir noch nicht. Sehr wahrscheinlich ist auch das Carotin beteiligt, wie schon Buller (1933) vermutet hatte. Er hielt es für möglich, daß die von Walker und Anderson (1925) in der Collenchymschicht der Gleba-Umhüllung beobachtete Umwandlung von Glykogen in reduzierenden Zucker durch Licht gefördert werde. Die dadurch bewirkte Erhöhung des osmotischen Wertes in den Zellen setzt bekanntlich erst den Abschlußmechanismus in Tätigkeit. Nach Bünning (1937/38, 1953) wirkt das Licht, wie schon erwähnt, als Sensibilisator: Das vom Carotin absorbierte Licht löst eine photochemische Reizkette aus, deren letztes Glied bei *Sphaerobolus* der Abschuß der Gleba wäre. Da wir aber das Wirkungsspektrum des Lichtes hierfür noch nicht kennen, erübrigt sich eine weitere Diskussion. Unsere Untersuchungen haben endlich gezeigt, daß von der lichtbedingten Auslösung dieser Vorgänge bis zum Abschleudern der Gleba ein ganzer Tag verstreicht. Nicht das Licht des Abschußtages entscheidet, sondern das des vorausgegangenen Tages. Dadurch unterscheidet sich *Sphaerobolus* von *Pilobolus*. Der differenzierte Bau der Gleba-Umhüllung ist vermutlich die Ursache hierfür.

Zusammenfassung

1. Das im Mycel sowie in den Fruchtkörpern von *Sphaerobolus stellatus* enthaltene gelbe Pigment stellt ein neues, wenig beständiges Carotinoid dar, das im sichtbaren Licht folgende Absorptionsmaxima in Schwefelkohlenstoff besitzt: 464—465, 490—491 (Hauptgipfel) und 522—523 mμ.

2. Das als Sphaerobolin bezeichnete Carotinoid bildet sich nur im Licht. Besonders wirksam ist der Wellenlängenbereich von 365—500 mμ. Rotes Licht ist völlig unwirksam.

3. Der Farbstoff erscheint schon wenige Tage nach der ersten Belichtung in den Hyphen des Mycels. Nach Anlage der Fruchtkörper verschwindet er aus dem Mycel und reichert sich in den Fruchtkörpern an.

4. Auch die Anlage und Entwicklung der Fruchtkörper ist lichtabhängig.

5. Ebenso erfolgt die Auslösung des Abschusses der Gleben nur im Licht. Im 12:12stündigen Licht-Dunkel-Wechsel fällt die Abschußtätigkeit daher immer in die Lichtperioden.

6. Die tägliche Abschußtätigkeit im 12:12stündigen Cyclus wird stets durch die Lichtperiode des vorausgegangenen Tages ausgelöst.

7. Außer der täglichen, vom Lichtwechsel gesteuerten, zeigt *Sphaerobolus* noch eine langfristige Abschußrhythmik, die wahrscheinlich von Ernährungseinflüssen abhängt.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

Literatur

Bünning, E.: Phototropismus und Carotinoide. II. Das Carotin der Reizaufnahmezonen von Pilobolus, Phycomyces und Avena. Planta (Berl.) **27**, 148—158 (1937/38). — Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze. Berlin: Springer 1953. — Bulat, Th. J.: Effect of light on color in Dacrymyces. Mycologia (N.Y.) **46**, 32—36 (1954). — Buller, A. H. R.: Researches on Fungi, Vol. 5. London 1933. — Carlile, M. J.: A study of the factors influencing nongenetic variation in a strain of Fusarium oxysporum. J. Gen. Microbiol. **14**, 643—654 (1956). — Carlile, M. J., and J. Friend: Carotenoids and reproduction in Pyronema confluens. Nature (Lond.) **178**, 369—370 (1956). — Deventer, W. F. van: De kleurstoffen van Neurospora sitophila Shear et Dodge. Thesis Utrecht 1930. — Garton, G. A., T. W. Goodwin and W. Lijinsky: Studies in carotenogenesis I. General conditions governing carotene synthesis by the fungus Phycomyces blakesleeanus Burgeff. Biochemic. J. **48**, 154—163 (1951). — Goodwin, T. W.: Carotenoids. Annual Rev. Biochem. **24**, 497—522 (1955). — Haskins, R. H., and W. H. Weston jr.: Studies in the lower Chytridiales. I. Factors affecting pigmentation, growth and metabolism of a strain of Karlingia (Rhizophlyctis) rosea. Amer. J. Bot. **37**, 739—750 (1950). — Haxo, F.: Studies on the carotenoid pigment of Neurospora. I. Composition of the pigment. Arch. of Biochem. **20**, 400 (1949). — Some biochemical aspects of fungal carotenoids. Fortschr. Chem. organ. Naturstoffe **12**, 169—197 (1956). — Karrer, P., u. E. Jucker: Carotinoide. Basel: Birkhäuser 1948. — Lorenz, F.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Sphaerobolus. Arch. Protistenkde **81**, 361—398 (1933/34). — Nuernbergk, E. L.: Zur Technik der vergleichenden Messung der Photosynthese mittels des URAS und ihre Anwendung auf die Untersuchung periodischer Photosynthese-Kurven. Gartenbauwiss. **2** (**20**), 58—91 (1955). — Robinson, W.: The conditions of growth and development of Pyronema confluens Tul. [P. omphaloides (Bull.) Fuckel]. — Schopfer, W. H.: Plants and vitamins, p. 81. Walthem, Mass. U.S.A. 1949. — Walker, L. B., and E. Anderson: Relation of glycogen to sporeejection. Mycologia (N. Y.) **17**, 154—159 (1925). — Went, F. A.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Entstehung des Carotins und auf die Zersetzung der Enzyme. Rec. Trav. bot. néerl. **1**, 106—119 (1904). — Zalokar, M.: Studies on biosynthesis of carotenoids in Neurospora crassa. Arch. of Biochem. a. Biophysics **50**, 71 (1954). — Biosynthesis of carotenoids in Neurospora. Action spectrum of photoactivation. Arch. of Biochem. a. Biophysics **56**, 318 (1955).

Prof. Dr. H. Engel, Dr. Ingeborg Friederichsen,
Inst. für Allg. Botanik, Hamburg 36, Jungiusstr. 3—6

Planta, Bd. 49, S. 588—597 (1957)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock

WEITERE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN NATIVEN WUCHSSTOFF

Von

HANNE-LORE WIEDOW-PÄTZOLD und HERMANN v. GUTTENBERG

(Eingegangen am 14. Mai 1957)

In seinen Untersuchungen über die chemische Natur des pflanzlichen Wuchsstoffes (WSt) hatte KÖGL (1933) zwei gänzlich verschiedene Substanzen, nämlich das von ihm so benannte Auxin (a und b) und die β-Indolylessigsäure (IES = Heteroauxin) als fast gleich wirksame Faktoren beschrieben. Diese zwar mögliche, aber doch sehr unwahrscheinliche Behauptung veranlaßte den Seniorautor, eine Prüfung an verschiedenen Objekten durchzuführen. Nach einer Angabe von KÖGL, ERXLEBEN und HAAGEN-SMIT (1934) schien es nicht schwer, eine Entscheidung zu treffen: sollte doch das Auxin säurefest und laugenzerstörbar sein und die IES sich gerade umgekehrt verhalten. Um sicher zu sein, daß das Versuchsmaterial reichlich IES enthalte, wurde das erste Versuchsobjekt (*Coleus*-Internodien) nach dem Verfahren von SUTTER (1944) durch längeres Einlegen in eine IES-Lösung 10^{-5} g/cm^3 mit diesem Stoff „gefüttert", und es wurden dann die aus Extrakten gewonnenen Wuchsstoffmengen auf ihr Verhalten gegen Lauge und Säure geprüft (v. GUTTENBERG 1942 und DETTWEILER 1943). Es ergab sich, daß tatsächlich neben dem laugenfesten ein säurefester Wuchsstoff vorhanden war, und wir kamen zu der Ansicht, daß der erste der IES, der zweite möglicherweise dem Köglschen Auxin entspräche. Wir dehnten später die Untersuchung auf weitere Objekte aus. Als neue Untersuchungsmethode wurde die spezifische Zerstörbarkeit der IES durch eine Oxydase (Erbsenenzym = EE, TANG und BONNER 1947) bekannt, auch mehrfach festgestellt, daß die Säure-Laugenmethode unverläßlich sei (FUCHS 1949). Wir bevorzugten daher nun das genannte Enzym zur Entscheidung, fanden aber wieder, daß auch jetzt ein im Avenatest stark wirksamer WSt neben der zerstörten IES vorhanden war. Das bestärkte uns naturgemäß in der Annahme, es gäbe einen zweiten WSt. An eine Möglichkeit war freilich noch zu denken. Es konnte sein, daß die Unzerstörbarkeit des Restes sich daraus erkläre, daß eine zu hohe Konzentration des Wuchsstoffes vorlag. Da das Ausgangsmaterial mit IES vorbehandelt war und die Extrakte eingeengt wurden, mußte mit einer künstlichen Erhöhung des WSt-Gehaltes gerechnet werden.

Deshalb stellten wir mehrfach Kontrollen mit auf 1:10 verdünnter Ausgangslösung her. Wurde doch für die Einwirkung von Salzsäure, später auch für die von Erbsenenzym, festgestellt, daß in beiden Fällen eine vollständige Zerstörung nur bei einer Konzentration bis 10^{-5} g/cm^3 eintritt. Eine starke Überkonzentration wirkt sich im Avenatest durch geringe und stark schwankende Winkel aus. Solche bemerkten wir im allgemeinen nicht, vor allem aber fanden wir, daß bei $^1/_{10}$ Verdünnung immer wieder beiderlei Stoffe erschienen. Wir verwarfen daher die Ansicht, daß der säure- und enzymfeste Anteil nichts anderes als ein unzerstörter Rest von IES sei. Wie wir später sehen werden, geschah dies zu Unrecht. Es ergab sich aber auch, daß für das Erbsenenzym höchst unerwartete Verhältnisse vorliegen, die zu einer Täuschung führen mußten.

Einstweilen war bekannt geworden, daß das Köglsche Auxin nicht wieder darstellbar war, daß also offenbar der dem Auxin zugesprochene Wachstumseffekt auf Reste von IES zurückzuführen war, die gleichfalls bei der durchgeführten Säurezerstörung erhalten geblieben waren. Das mußte unsere Ausgangsvorstellung erschüttern. Es war nunmehr auch ein neuer Weg zur Identifizierung der Substanzen bekannt geworden, nämlich die Adsorptionschromatographie, derer wir uns sofort bedienten. In Arbeiten von Nehring (1954) und Bergmann (1955) wandten wir diese Methode, z. T. verbunden mit Elektrophorese an. Über die Arbeit von Nehring wurde ein kurzer Bericht (v. Guttenberg, Nehring und Blanke 1954) veröffentlicht. Auch bei der Chromatographie erhielten wir noch beiderlei WSt, wieder gab die 1:10-Verdünnung keinen Anlaß, einen Irrtum zu befürchten. Beiderlei WSt erschienen vor der Zerstörung im Papierstreifen aneinander anschließend und ließen sich durch Behandlung mit EE isolieren. Aber bei einer Aufteilung der Streifen in sehr schmale Abschnitte fand Bergmann, daß der sich nicht mehr färbende, aber im Test aktive „Schwanz" einen allmählichen Übergang von großen zu kleinen Krümmungswinkeln ergab, wenn die Stoffe durch die „Abklatschmethode" in Agar überführt wurden.

Schon andere Autoren wiesen auf „Verschleppung" von WSt bei der Chromatographie hin. Eine Diagrammtafel von Luckwill (1952) zeigt für synthetisch hergestellte reine IES neben dem stark ausgeprägten Hauptgipfel zwei kleinere Nebengipfel, einmal mit niedrigerem, einmal mit höherem Rf-Wert. Diese Unreinheit dürfte auf Zersetzungserscheinungen der IES (Brauner 1952, v. Denffer 1952) zurückzuführen sein. Terpstra (1953) stellte im Papierchromatogramm eine Verschiebung bei IES, gewonnen aus Avenakoleoptilextrakten, fest. Sie führt diese „Schwanzbildung" auf anwesende Begleitstoffe zurück.

Eine bei der Firma Zeiss-Jena durchgeführte Prüfung des UV-Absorptionsspektrums ergab für den nach Säurebehandlung übrig-

bleibenden aktiven WSt-Rest weitgehende Übereinstimmung mit IES. Dazukam, daß in einer Studie von BLANKE (mitgeteilt in Naturw. 1954), die das Molekulargewicht des nicht zerstörten Teiles mit der Diffusionsmethode bestimmte, ein Molekulargewicht von 175 und 210 gefunden wurde, ein Wert also, der mit dem theoretischen der IES (175) gut übereinstimmt. Damit wurde die Wahrscheinlichkeit, daß auch der durch das Enzym nicht zerstörte Rest, wenn auch vielleicht in modifizierter Form, doch IES sei, erhöht. Wir nahmen die Versuche daher nochmals auf und können im folgenden darüber berichten.

Methodik. Das zerkleinerte Pflanzenmaterial wurde in allen Versuchen durch 2stündiges Kochen mit 96%igem Alkohol am Rückflußkühler extrahiert. Eine Trennung erfolgte nach der von LARSEN (1939, 1944) angegebenen Methode. Der Alkohol wurde auf dem Wasserbad abgedampft, der Rückstand mit Aqua dest. aufgenommen, mit Na_2HCO_3 (p_H 9) versetzt und 3mal mit Narkoseäther ausgeschüttelt. Nach Abtrennung der neutralen Stoffe wurde der wäßrige Rückstand mit Weinsäure angesäuert (p_H 3) und erneut mit Äther ausgeschüttelt „saure Phase"). Zur Bestimmung des WSt diente der Avenatest, die Messung der Winkel erfolgte nach der Methode von SÖDING (1952). Fehlerangaben wurden bei den einzelnen Versuchsserien nicht vermerkt, da nur Versuche mit Winkelschwankungen, die im Vergleich zur IES-Kontrolle innerhalb der Fehlergrenze lagen, ausgewertet wurden. Überschreitet die WSt-Konzentration den physiologischen Optimalwert, findet infolge „Überkonzentration" eine Winkelverkleinerung statt. Der Einwand, daß sich niedrige Überkonzentrationswinkel durch große mittlere Fehler verraten, ist bei Verwendung sehr gleichmäßigen Testmaterials in den Konzentrationsbereichen 5×10^{-5} bis 10^{-6} nicht immer zutreffend. Auch bei diesen „unphysiologischen" Winkeln können normale Differenzen auftreten, so daß eine Täuschung bezüglich der vorliegenden Konzentration leicht möglich ist. Überkonzentrationen werden viel sicherer durch die oft enormen Winkelwerte nach 18 Std Testzeit nachgewiesen. In den folgenden Tabellen auftretende kleinere Winkeldifferenzen bei Parallelversuchen sind einmal im Vergleich mit Standardkurven auf das unterschiedliche Reagieren der Avenakoleoptilen, wohl infolge klimatischer Tagesschwankungen zurückzuführen, zum anderen dürfte die Menge des extrahierten WSt nicht immer völlig gleich sein.

In unseren Untersuchungen galt es zunächst, die Frage der Konzentration zu prüfen. Da NEHRING und BERGMANN in ihren Versuchen 300 mit IES vorbehandelte *Helianthus*-Hypokotyle verwendet hatten, extrahierten auch wir zunächst die gleiche Menge nach der oben beschriebenen Methode. Wir stellten mehrere Verdünnungsstufen her und prüften ihre Resistenz gegenüber Säure und Erbsenenzym. Die Tabelle 1 gibt Aufschluß über die sehr hohe Anfangskonzentration, die ungefähr 5×10^{-4} g/cm³ beträgt, wie eine zu dieser Zeit gültige IES-Standardkurve und die Färbungen des Chromatogramms zeigen. Nach 18 Std Wirkungszeit im Avenatest steigen die Winkel auf einen Maximalwert an, ein deutliches Zeichen einer Überkonzentration. Auch eine Verdünnung der Ausgangssubstanz auf 1:10 täuscht noch eine zu niedrige Konzentration vor, denn erst bei einer Verdünnung um das 100fache erreicht die saure Phase im Avenatest Winkelwerte, die ungefähr einer

Tabelle 1. *300 Helianthus-Hypokotyle, 21 Std vorbehandelt in Nährlösung + IES 10^{-5} g/cm³, negative Winkel in Grad*

	s	s/10	s/100	s/1000	s + HCl	s/10 + HCl	s/100 + HCl	Art der Anwendung von HCl	s + EE	s/10 + EE	s/100 + EE
1.	11	25	41	11	41	15	8	3½ Std mit 1n HCl gekocht	17	36	20
2.	12	32	49	10	14	0	0	3½ Std gekocht mit 1n + 1 cm³ konz. HCl	18	44	20
3.	13	25	42	10	17	0	0	wie oben	19	35	21
4.	15	28	44	14	21	0	0	mit 1n HCl abgedampft	20	35	20
5.	—	—	40	10	44	14	14	3½ Std mit 1n HCl gekocht	16	45	18

Es bedeuten hier und später: s = saure Phase des Extraktes, s/10, s/100, s/1000 die jeweilige Verdünnungsstufen. EE = Erbsenenzym

Konzentration von 10^{-7} g/cm³ entsprechen. Die 1000fache Konzentrationsverminderung ergibt dann erheblich kleinere Winkelwerte. Für ganz genaue quantitative Bestimmungen hätten natürlich bei der Verdünnung noch Zwischenstufen eingeschaltet werden müssen.

Da schon Fuchs (1949) die übliche Säure-Laugenbehandlung von Extrakten zur Prüfung auf Heteroauxin oder Auxin beanstandete, verwendeten wir HCl verschiedener Konzentration und kochten entweder 3 Std am Rückflußkühler oder dampften direkt mit HCl ab. Dieses geschah folgendermaßen: Die Ätherausschüttlung der sauren Phase wurde bis zur Trockne abgedampft und sofort mit 10 cm³ 1 n HCl aufgenommen. Nachdem auch diese 10 cm³ HCl abgedampft waren, wurde Äther hinzugesetzt, nach dessen Verdampfen Aqua dest. Tabelle 1 zeigt, daß durch 3½stündiges Kochen mit 1n HCl ein stetiger Winkelabfall bei den Verdünnungsstufen erfolgt. Da die saure Phase in 1. und 5. Winkel erzeugt, die in ihrer Höhe denen der 100fachen Verdünnung entsprechen, dürfen wir daraus schließen, daß durch Kochen mit 1n HCl eine Verringerung der Konzentration um 2 bis 3 Zehnerpotenzen eintritt. Fügt man zu 4 cm³ nHCL 1 cm³ konzentrierte HCl oder wird mit Salzsäure abgedampft, so ist die Zerstörungsquote des WSt erheblich größer, doch ist die Methode sehr grob, so daß wir hieraus keine weiteren Schlüsse ziehen möchten.

Die Behandlung mit Erbsenenzym war nun die uns am meisten interessierende Frage. Die Herstellung des Enzyms erfolgte nach der von Tang und Bonner (1947) angegebenen Methode; wir ließen es in der üblichen Weise 5 Std bei 37° einwirken. Kontrollen von IES in wäßriger Lösung von der Konzentration 10^{-5} g/cm³ wurden innerhalb dieser Zeit restlos zerstört, IES 10^{-4} g/cm³ dagegen nicht total, es blieben Winkel von 15—20° übrig. In Versuchen von Feldmeier und Guttenberg (1953) wurde bei der oben beschriebenen Methode IES 10^{-4} g/cm³ durch das Erbsenenzym vollständig inaktiviert. Es ist zu

vermuten, daß dabei die am Licht und bei O_2-Zutritt leicht zerstörbare Substanz z. T. zerstört war.

Bei Betrachtung der Tabelle 1 möchte man zunächst annehmen, daß die Winkel der sauren Phase, behandelt mit Erbsenenzym (s + EE), einem nicht zerstörten Rest entsprechen, doch die Verdünnung auf das 10fache zeigt, daß es sich auch hier noch um eine Überkonzentration handelt, da bei s/10 + EE ein beträchtlicher Winkelanstieg erfolgt und dann erst ein Abfall, allerdings auch nur um 15 bis 20°. Es fragte sich nun, wie diese Resistenz gegen die Enzymzerstörung zu erklären sei.

Wie leicht es zu Trugschlüssen kommen kann und wie wichtig ein breites Arbeiten ist, sei noch an folgender Tabelle gezeigt, die einen Versuch wiedergibt, bei dem die Plumula am Hypokotyl belassen wurde.

Tabelle 2. *30 Helianthus-Hypokotyle + Plumula, vorbehandelt 21 Std in 100 cm³ Nährlösung + IES 10^{-5} g/cm³; Avenatest, negative Winkel in Grad*

	s	s/10	s + EE	s/10 + EE	s + EE + EE	s + EE + EE + EE	s + 1n HCl	s + HCl + HCl (1n)
1.	48	45	56	28	39	—	—	—
2.	48	50	35	37	—	—	—	—
3.	35	35	40	34	27	—	—	—
4.	35	49	48	—	37	—	—	—
5.	39	40	39	26	48	35	—	—
6.	32	—	37	—	39	20	—	—
7.	29	51	—	—	—	—	26	0
8.	29	55	—	—	—	—	20	0

Die Versuche der Tabelle 2 wurden im Dezember und Januar durchgeführt, die Koleoptilen reagierten zu dieser Zeit, wohl infolge des milden Wetters, sehr gut und die Winkelwerte der Standardkurve lagen etwas höher. — Da das Ausgangsmaterial bei den Versuchen der Tabelle 2 nur 30 Hypokotyle betrug, also nur ein Zehntel der Menge der in Tabelle 1 beschriebenen Experimente, müßte sich eigentlich ein besser durchschaubares Bild auf Grund der Wirkung im Avenatest ergeben. Die Tabelle 2 zeigt jedoch, daß auch bei Verwendung von nur 30 mit IES gefütterten *Helianthus*-Hypokotylen noch eine hohe WSt-Konzentration vorhanden ist, die zwar nicht mehr so stark hemmt, aber noch so hoch ist, daß der Zusatz von EE zur sauren Phase oft gar keine oder nur geringe Winkelverminderung hervorruft. Bei einigen Versuchen wurde nach der 5stündigen Enzymeinwirkung die Mischung durch Zusatz von Weinsäure auf p_H 3 gebracht, mit Äther ausgeschüttelt und der mit Wasser aufgenommene Rückstand nochmals mit EE versetzt (+EE+EE), doch blieb auch hier, ebenso nach 2maliger Ausschüttelung und 3maligem Erbsenenzymzusatz (s+ EE + EE + EE) ein im Avenatest wirksamer Rest übrig; der Winkelabfall betrug wieder

nur 10 bis 20°. Dieser geringe Winkelabfall soll später noch genauer behandelt werden.

Das Kochen mit 1n HCl wirkte auch in dieser Versuchsreihe energischer auf den extrahierten WSt als das EE. Die Wirkung der sauren Phase wurde bereits durch 1maliges Kochen so sehr verringert, daß sie im Avenatest nicht mehr „überkonzentriert" erschien, wie eine in der Tabelle 2 nicht angeführte weitere Verdünnungsstufe zeigte. Wurde der bei Säurebehandlung übrigbleibende Rest nochmals mit HCl am Rückflußkühler $3^1/_2$ Std gekocht, so trat völlige Zerstörung ein, was auf alleinige IES hinweist.

Tabelle 3. *10 Helianthus-Hypokotyle, 21 Std vorbehandelt mit IES 10^{-5} g/cm³, Avenatest, negative Winkel in Grad; Alkoholextrakt*

s	s/10	s+EE	s/10+EE	s+EE+EE
47	10	35	0	—
31	—	20	—	0
45	—	28	—	0
40	—	26	—	0

Ursache der hohen Konzentration bei Verwendung von nur 30 *Helianthus*-Hypokotylen (Tabelle 2) ist vermutlich das Vorhandensein der Plumula. Wahrscheinlich steigt der Gehalt an IES durch den eigenen WSt-Spiegel der Plumula oder durch ihr Speichervermögen sehr an und führt zu unübersichtlichen Ergebnissen. Man muß also sehr darauf achten, daß bei Fütterungsversuchen von Hypo- oder Epikotylen die Sproßspitze immer völlig entfernt oder immer belassen wird.

Ein Beispiel möge das erläutern! Werden 30 mit IES vorbehandelte *Helianthus*-Hypokotyle (ohne Plumulareste!) mit Alkohol extrahiert und im Avenatest geprüft, so ergibt sich folgendes Bild:

s: −43° s + EE: −29°
s/10: −34° s/10 + EE: −10°
s/100: 0 s/100 + EE: 0

Hier zeigt die unverdünnte saure Phase zwar schon die höchsten Winkelgrade, doch liegen die Werte von s und s/10 so nahe beieinander, daß der Maximalwert zwischen ihnen liegen könnte. Die Zerstörung durch Erbsenenzym entspricht dem aus den anderen Tabellen schon bekannten Verhältnis, wieder beträgt die Höhe der zerstörten Winkelgrade nur 14°.

Um gleich anfangs eine Überkonzentration auszuschalten, wurde die verwendete Materialmenge noch verringert. Es wurden nur noch 10 *Helianthus*-Hypokotyle, 21 Std mit IES 10^{-5} g/cm³ vorbehandelt, extrahiert. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3. Da die Zehntelverdünnung nur noch Winkelgrade um 10 erzeugte, die durch Erbsenenzym zerstört wurden, unterließen wir später eine Verdünnung.

Bei Verwendung von 10 mit IES vorbehandelten Hypokotylen ergibt sich nach Tabelle 3 einwandfrei, daß die unverdünnte saure Phase etwa die optimale Wirkung hat, der Winkelabfall bei der 10fachen

Verdünnung ist beträchtlich. Der Zusatz von Erbsenenzym zeigt aber keine vollkommene Zerstörung, sondern wiederum nur eine Winkelminderung um 10 bis 20°. Auf Grund dieser Tatsache, daß ein verbleibender Rest vorhanden ist, ist es zu erklären, daß wir früher zu der Auffassung gelangten, es werde nur das Heteroauxin (IES) zerstört und es bliebe ein enzymfester WSt übrig. Diese Auffassung wurde noch dadurch bestärkt, daß synthetische IES in wäßriger Lösung in Konzentrationen, die, z. B. auf Tabelle 3 bezogen, negative Winkel von 47, 31, 45, 40° im Avenatest erzeugen, ohne weiteres durch das Erbsenenzym zerstört wurden. In einigen Fällen wurde allerdings auch die Konzentration, die durch die Fütterung mit IES sehr erhöht war, nicht genügend beachtet. Denn wie wir in der vorliegenden Studie zeigen konnten, genügt oft die Verdünnung auf 1:10 nicht, die „Überkonzentration" zu beheben. Bei der 100fachen Verdünnung steigen die Winkelwerte noch an und verringern sich erst bei weiterer Konzentrationsminderung. Daß jedoch der in Tabelle 3 nach Erbsenenzym verbleibende Rest auch nur IES ist, beweist eine nochmalige Enzymbehandlung (s + EE + EE). Schüttelt man den bei s + EE verbleibenden Rest bei p_H 3 mit Äther aus und versetzt den mit Wasser aufgenommenen Rückstand nochmals 5 Std mit Erbsenenzym, so tritt völlige Zerstörung ein. Also besteht der „Rest" doch aus unzerstörtem, besser gesagt nicht angegriffenem Heteroauxin (IES). Wie kommt aber diese nur teilweise Zerstörung zustande?

Nach Brauner (1953) wird die IES durch Einwirkung von UV-Licht photolytisch zersetzt. Versuche von Mayr (1956) zeigten nun, daß man sehr wohl zwischen synthetischer IES in wäßriger Lösung und IES in alkoholischen Pflanzenextrakten unterscheiden muß, denn Experimente ergaben eindeutig, daß in alkoholischen Pflanzenextrakten vorliegende IES gegenüber der Bestrahlung einer Hg-Dampflampe zunächst vollkommen immun war und keine photolytische Zersetzung eintrat. Erst nach 260 min war die IES zersetzt, die gleiche Menge synthetischer IES in 2%iger alkoholischer Lösung dagegen schon nach 30 min. Zu der Zeit, als diese Ergebnisse von Mayr (1956) veröffentlicht wurden, hatten wir bereits das entsprechende Verhalten von IES in alkoholischen Pflanzenextrakten gegenüber der Einwirkung von Erbsenenzym festgestellt. Schon Wiedow-Pätzold (1955) wies darauf hin, daß IES 10^{-6} g/cm³, einer neutralen Ätherausschüttelung eines Alkoholextraktes hinzugefügt, durch Behandlung mit Erbsenenzym seine Wirkungsaktivität im Avenatest nicht verliert. Wir nahmen damals irrtümlicherweise an, daß ein Blockierungsstoff lediglich in der neutralen Phase vorkomme.

Um zu sehen, ob im Extrakt vorhandene Substanzen die „Blockierung" bewirken, wurde dem ausgeschüttelten Extraktrückstand, aus

dem also durch neutrale und saure Ausschüttelung alle ätherlöslichen WSt abgetrennt waren, IES in der Konzentration 10^{-5} g/cm³ hinzugesetzt. Es handelt sich hier also um eine Konzentration, die in wäßriger Lösung durch Enzymzusatz immer zerstört wird. Überraschenderweise ergab sich nun, daß reine IES 10^{-5} g/cm³, mit Äther aus einem wuchsstofffreien Extraktrückstand ausgeschüttelt, durch Erbsenenzym nur zu einem geringen Teil angreifbar ist. Nach der üblichen Einwirkungszeit von 5 Std lassen die im Avenatest auftretenden Winkel auf eine Konzentration von 10^{-7} g/cm³ schließen, eine weitere Inaktivierung hatte sogar nach 21stündiger Behandlungsdauer noch nicht stattgefunden. Tabelle 4 zeigt eine Auswahl der sehr zahlreichen Versuchsserien.

Tabelle 4. *Extraktrückstand von 20 Helianthus-Hypokotylen (ungefähr 5 g), Zusatz von IES 10^{-5} g/cm³, Zusatz von Erbsenenzym. Avenatest, negative Winkel*

Nach 5 Std	Nach 21 Std
46	—
55	—
45	44
50	50

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß man unbedingt zwischen reiner IES in wäßriger Lösung und IES, gewonnen aus alkoholischen Pflanzenextrakten, unterscheiden muß. Bei letzterer muß ein ätherlöslicher Beistoff vorhanden sein, der eine Zerstörung, sowohl durch UV-Licht (Mayr 1956) als auch durch Erbsenenzym verhindert. Dieser Stoff geht sowohl aus alkalischem Milieu (p_H 9, Wiedow-Pätzold) als auch aus saurem p_H-Bereich in Äther über.

Obwohl es unwahrscheinlich ist, daß eine im Substrat vorliegende Reduktase einer spezialisierten Peroxydase ,wie die IES-Oxydase es ist (Tang und Bonner 1947, Goldacre 1951, Galston, Bonner und Baker 1953), entgegenwirkt, wurde nder Extraktrückstand und die einzelnen Phasen mit Trimethyltetrazoliumchlorid (TTC) auf reduzierende Substanzen geprüft. TTC ist ein Redoxindikator, der in oxydiertem Zustand farblos ist und durch Reduktion in das rote Formazan übergeht (Kuhn und Jerchel 1941, Lakon 1942). Bei TTC-Zusatz zeigte sich eine Rotfärbung zwar im Extraktrückstand, doch nicht in der sauren oder neutralen Ätherausschüttelung. Somit kann eine Redoxwirkung für die gehemmte IES-Inaktivierung nicht in Frage kommen. Nach unseren Überlegungen könnte ein im Alkoholextrakt vorliegender ätherlöslicher Stoff eine Inaktivierung der IES in folgender Weise verhindern: Entweder besitzt die Flavinkomponente der IES-Oxydase zu der „schützenden" Substanz eine größere Affinität als zur IES selbst oder dieser fragliche Stoff geht mit der IES eine, vielleicht nur lockere, Verbindung ein, so daß die Peroxydase keinen Angriffspunkt mehr besitzt. Diese Frage konnte jedoch noch nicht geklärt werden.

Zusammenfassung

Eine Fortsetzung unserer Studien über das Vorkommen eines „säure- und erbsenenzymfesten" Wuchsstoffes, den wir in einer Reihe von Arbeiten beschrieben hatten, machte es wahrscheinlich, daß dieser doch mit IES identisch sei. Dafür sprachen chromatographische Untersuchungen, die einen ähnlichen Rf-Wert ergaben, ferner ein der IES etwa entsprechendes Molekulargewicht und schließlich das Ergebnis einer UV-Absorptionsanalyse. Es handelte sich nunmehr darum, festzustellen, wie sich die bisher beobachtete Resistenz gegen die Einwirkung von HCl und Erbsenenzym erklären lasse. Bezüglich der letzten ergab sich eine überraschende Feststellung. Ein in alkoholischen Extrakten vorhandener Stoff setzt die Wirksamkeit des Erbsenenzyms weitestgehend herab. Dies wird besonders dadurch bewiesen, daß reine IES schon in der Konzentration 10^{-5} g/cm³ nach Zusatz wuchsstofffreien Extraktrückstandes durch die IES-Oxydase nur zum geringen Teil zerstört wird. Bei Verwendung von Säure wird Unzerstörbarkeit leicht durch die bei der Einengung der Extrakte entstehende Konzentrationserhöhung vorgetäuscht. Die beschriebene „Schutzwirkung" des Extraktes war schon in eigenen früheren Versuchen, sowie von Mayr (1956) gegenüber UV-Licht beobachtet worden. Die Natur des fraglichen Stoffes wäre durch weitere Versuche zu klären.

Literatur

Bergmann, R.: Papierchromatographische und papierelektrophoretische Untersuchungen über den Wuchsstoffgehalt von Helianthushypokotylen vor und nach Behandlung mit Heteroauxin. Diplomarbeit Rostock 1955. — Blanke, I.: Molekulargewichtsbestimmungen des „säurefesten" Wuchsstoffes. Diss. Rostock 1954. Brauner, L.: Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. Z. Bot. **41** (1953). — Denffer, D. v., M. Behrens u. A. Fischer: Papierchromatographischer und papierelektrophoretischer Nachweis des β-Indolacetonitrils und des β-Indolaldehyds in Extrakten aus Kohlpflanzen. Naturwiss. **39** (1952). — Denffer, D. v., u. A. Fischer: Papierchromatographischer Nachweis des β-Indolaldehyds in photolytisch zersetzter Indolessigsäurelösung. Naturwiss. **39** (1952). — Dettweiler, Chr.: Über den Einfluß des Heteroauxins auf die Wuchsstoffbildung in höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **33** (1943). — Feldmeier, I., u. H. v. Guttenberg: Über das Vorkommen von Wuchs- und Hemmstoffen in Samen und Keimpflanzen von Phaseolus vulgaris. Planta (Berl.) **42** (1953). — Fuchs, A.: Die Bedeutung synthetischer Wuchsstoffe für Physiologie und Landwirtschaft. Angew. Chem. **61** (1949). — Galston, A. W., J. Bonner and R. S. Baker: Flavoprotein and peroxidase as components of the indole-acetic oxydase system. Arch. of Biochem. a. Biophysics **42** (1953). — Goldacre, P. L.: Hydrogenperoxide in the enzymatic oxidation of heteroauxin. Austral. J. Sci. Res., Ser. B **4** (1951). — Guttenberg, H. v., u. I. Eifler: Über die Wanderung der Wuchsstoffe in Helianthus-Hypokotylen. Ber. dtsch. bot. Ges. **65** (1952). — Guttenberg, H. v., I. Eifler u. G. Nehring: Die Wuchsstoffe von Coleus, Cucumis und Helianthus. Planta (Berl.) **42** (1953). — Guttenberg, H. v., u. E. Lehle-Joerges: Über das Vorkommen von Auxin und Heteroauxin in ruhenden und keimenden Samen.

Planta (Berl.) **35** (1948). — Guttenberg, H. v., G. Nehring u. I. Blanke: Papierchromatographische Untersuchung und Molekulargewichtsbestimmung des „Säurefesten Wuchsstoffes." Naturwiss. **41** (1954). — Kögl, F.: Die Chemie des Auxins und sein Vorkommen im Pflanzen- und Tierreich. Naturwiss. **21** (1933). — Kögl, F., A. Haagen-Smit u. H. Erxleben: Über die Isolierung der Auxine a und b aus pflanzlichen Materialien. Hoppe-Seylers Z. **228** (1934). — Kuhn, R., u. D. Jerchel: Über Invertseifen. VIII. Mitt. Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. Ber. dtsch. chem. Ges. **74** (1941). — Lakon, H.: Topographischer Nachweis der Keimfähigkeit von Mais durch Tetrazoliumsalze. Ber. dtsch. bot. Ges. **60** (1942). — Larsen, P.: Über die Hemmung des Streckungswachstums durch natürlich vorkommende ätherlösliche Stoffe. Planta (Berl.) **30** (1939/40). — 3-Indolacetaldehyd as a growth hormone in higher plants. Dansk bot. Ark. **11** (1944). — Luckwill, L. C.: Application of paper chromatography to the separation and identification of auxins and growth inhibitors. Nature (Lond.) **169** (1952). — Mayr, H. H.: Zur Photolyse von Indol-3-Essigsäure bei papierchromatographischen Arbeiten. Planta (Berl.) **46** (1956). — Nehring, G.: Papierchromatographische Untersuchungen über den säurefesten Wuchsstoff. Diss. Rostock 1954. — Söding, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart 1952. — Sutter, E.: Die chemische Bestimmung des Heteroauxins und Versuche über seine Aufnahme durch die Pflanze. Ber. schweiz. bot. Ges. **54** (1944). — Tang, Y. W., and J. Bonner: The inactivation of indoleacetic acid. Arch. of Biochem. **13** (1947). — Terpstra, W.: Chromatographic identification of the growth-substance, extracted from Avena coleoptile tips. Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch. Amsterd. C **56** (1953). — Wiedow-Pätzold, H.-L.: Studien über die „neutrale" Phase von Wuchsstoffextrakten. Ber. dtsch. bot. Ges. **68** (1955).

Prof. Dr. H. v. Guttenberg, Botanisches Institut der Universität, Rostock, Doberaner Straße 143

Planta, Bd. 49, S. 598—606 (1957)

Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn

ENTWICKLUNGSMORPHOLOGISCHE STUDIEN AM VEGETATIONSKEGEL VON HORDEUM DISTICHUM (ACKERMANNS ISARIA-GERSTE) IN ABHÄNGIGKEIT VON TAGESLÄNGE UND LICHTINTENSITÄT

Von

MARGARETE MUSCHIK

Mit 7 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. April 1957)

Die Kenntnis der Ausbildung und Differenzierung der embryonalen Ährenanlage muß vorausgehen, wenn man Umwelteinflüsse wie Licht, Tageslänge, Temperatur, Luft- und Bodenfeuchtigkeit sowie die Wirkung von Nähr- und Wuchsstoffgaben u. a. auf die Ährenbildung exakt analysieren will. Eine morphologische Entwicklungsstudie gibt dann erst die Grundlage, um eine Skala auszuarbeiten, in der die verschiedenen Entwicklungsstadien des Vegetationskegels bzw. der embryonalen Infloreszenz festgehalten werden.

Die Untersuchungen wurden an Ackermanns ISARIA-Gerste ausgeführt, einer genetisch gut durchgezüchteten 2-zeiligen Sommer-Varietät, die praktisch einer reinen Linie gleichkommt. Das ist wesentlich, wenn man von genetisch bedingten individuellen Schwankungen von vornherein unabhängig sein will.

Der Gamineensproß durchläuft bekanntlich in seiner Entwicklung zwei Phasen. In der ersten werden vom apikalen Meristem nur Blätter ausgegliedert und Seitenknospen angelegt, in der zweiten die Infloreszenz. Während der vegetativen Wachstumsperiode ist der Vegetationspunkt noch gänzlich undifferenziert und von mehr oder weniger halbkugeliger Gestalt. Beim Übergang in die reproduktive Entwicklungsphase tritt eine merkliche Streckung desselben ein (Abb. 1, Stad. 1). An dem nunmehr konisch werdenden Vegetationspunkt vollzieht sich die weitere Differenzierung. Es entstehen in akropetaler Folge alternierende Gewebewülste, die mehr als den halben Umfang der Vegetationskegelachse umschließen. Sie stellen Blattprimordien dar, aus deren Achseln die „Ährchenprimordien" hervorgehen (Stad. 2—4). SHARMANN (1945) und BARNARD (1955) stellten auf Grund histologischer Untersuchungen fest, daß die Bildung der Ährenanlage durch Teilung subhypodermaler Zellen zwischen zwei Blattprimordien eingeleitet wird. Die sich neubildende Gewebestruktur schiebt sich zwischen den Blattprimordien vor und, da sie ebenfalls halbachsenumfassend ist, bedingt sie zunächst das Auftreten

von Doppelringen bzw. Doppelwülsten am Vegetationskegel (Stad. 5—7). Das Folgestadium (8) zeigt bereits die hervorstehenden wulstartigen „Ährchenprimordien". Die Blattprimordien machen inzwischen eine

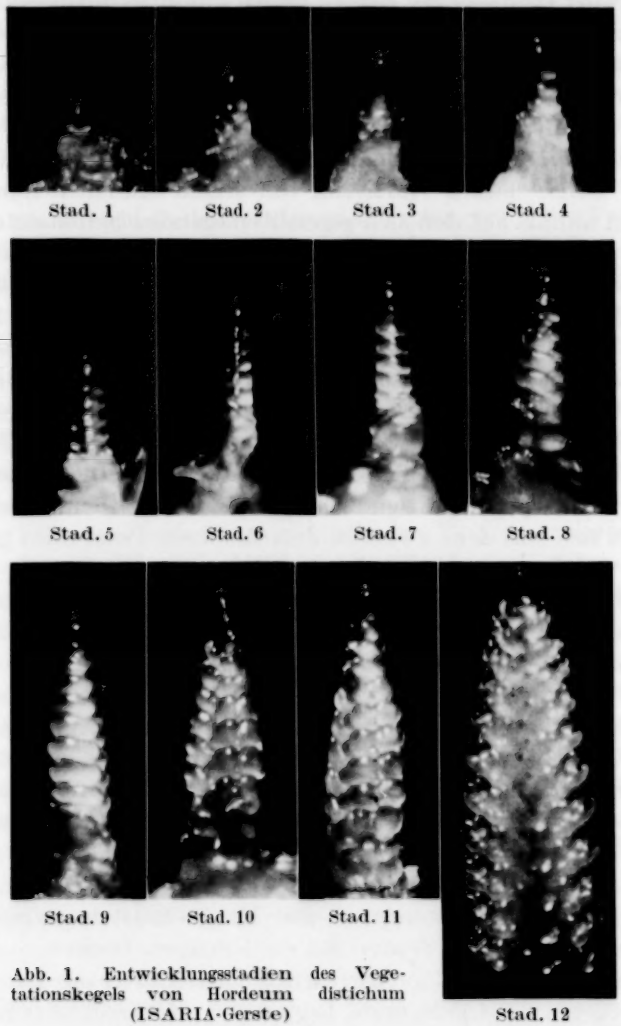


Abb. 1. Entwicklungsstadien des Vegetationskegels von Hordeum distichum (ISARIA-Gerste)

rückläufige Entwicklung durch und sind sehr bald kaum oder gar nicht mehr am Vegetationskegel kenntlich. Sie verschmelzen schließlich mit den einzelnen Knoten der Ährenachse.

Es ist nicht ganz korrekt und vor allem für den mit der Materie wenig Vertrauten nicht leicht zu verstehen, wenn in diesem Stadium — wie es in der Literatur häufig der Fall ist — von Ährchenprimordien gesprochen

wird. Richtiger scheint es, mit SCHUSTER (1910) von einem Ährchenkomplex zu sprechen. Schließlich stellen die sich vorschiebenden Gewebewülste nichts anderes dar als die Anlagen der achselständigen Seitenäste der Infloreszenz. Erst an diesen kommt es bei fortschreitender Differenzierung dadurch, daß zwei leichte Eindellungen (Stad. 9) auftreten, zur Primordienbildung des mittleren Ährchens und der beiden Seitenährchen. Die Ausdifferenzierung der einzelnen einblütigen Ährchen setzt mit der für beide Hüllspelzen gemeinsamen Anlage ein, die sich als halbmondförmiger Gewebering unter dem Ährchenprimordium ausgliedert. Durch starkes Wachstum der beiden seitlichen Randpartien erscheinen alsbald auf den sich gegenüberliegenden Seiten an der Basis des Ährchenprimordiums kleine Höcker, die zur ersten und zweiten Hüllspelze auswachsen (Stad. 10, 11). Es folgt dann die Ausbildung der Deckspelze, die als schwacher Gewebewall das Ährchenprimordium halb umschließt. Während der basale Teil der Spelzenanlage sehr langsam wächst, zeichnet sich der apikale durch ein auffallendes Spitzenwachstum aus, und die daraus resultierende Granne tritt zunächst als wesentlicher Spelzenanteil in Erscheinung (Stad. 12). Nach der Deckspelze differenziert sich die Vorspelze aus und danach die weiteren Blütenorgane wie die Antheren, die als papillenartige Bildungen sichtbar werden. Abschließend entwickelt sich aus dem zwischen den Antheren-Primordien gelegenen Meristem das Gynaeceum. Als letzte Blütenorgane werden die Schwellkörper angelegt. Wenn die Entwicklung des Androeceums und Gynaeceums genügend weit fortgeschritten ist, sind auch Deck- und Vorspelze lang genug, um diese Organe schützend einzuschließen.

In der Differenzierungsfolge werden zuerst die Ährchen in der Mittelregion der Infloreszenzachse betroffen, eine Erscheinung, die unter anderem auch beim Weizen auftritt. Die Förderung der Mittelregion wird während der ganzen Entwicklung der Ähre beibehalten. Hier finden sich später in der reifen Ähre auch die schwersten und bestentwickelten Körner. Der Annahme GOEBELS (1884), wonach die Ursache der verschiedenen Entwicklungsfolgen offenbar eine verschieden große und rasche Stoffzufuhr sei, stehen — wie HELM (1934) in seinen Untersuchungen an *Monerma repens Beauv.* aufzeigen konnte — die anatomischen Verhältnisse in den betreffenden Abschnitten der Infloreszenzanlage entgegen. Die geförderte Region von *Monerma* wies noch rein prokambiale Gefäßbündel auf, während die Basalregion schon differenzierte Xylemprimanen besaß, so daß hier auf Grund einer besseren Stoffversorgung eher eine Förderung hätte erwartet werden können.

Die Entwicklung der Ähre schreitet also, von der Mitte der Ährenachse ausgehend, zur Basis und schließlich zur Spitze hin fort, die sich — da sie inzwischen noch gewachsen ist und weitere Blattprimordien angelegt hat — als letzte ausdifferenziert. Im allgemeinen entwickeln sich

die mittleren Ährchen immer rascher als die Seitenährchen; letztere bleiben bei Hordeum distichum anscheinend durch irgendwelche hemmende Einflüsse zurück, sind unbegrannt und steril.

Eine gewisse Diskrepanz findet sich in der Literatur bei der Beurteilung des Überganges von der vegetativen zur reproduktiven Entwicklungsphase. Zu dieser Zeit setzt, wie schon erwähnt, die Streckung des Vegetationspunktes ein, in der offenbar qualitative Veränderungen ablaufen, die zur Bildung der Ährchenprimordien führen, so daß diese Periode — wie E. G. Minina, E. B. Igrizkaja, und P. P. Mazkewitsch (1940) betonen — zweifellos zur Ährchenphase gezählt werden muß. Auch Barnard sieht in der einsetzenden Verlängerung des Vegetationskegels das erste morphologische Anzeichen der Ährenbildung. Während die Entwicklungsumstimmung sich vollzieht, ist eine Mindestzahl von Blättern entfaltet und bereits sichtbar (Purvis 1934). v. Denffer (1950) bestätigt diese Feststellung, nimmt jedoch an, daß es sich „wahrscheinlich nur um die Anzahl der bereits im Embryonalzustand eindeutig determinierten Primordien handelt". Bezieht sich seine Annahme auf die im Embryo des reifen Kornes schon vorliegenden Primordienstrukturen, dann kann ihr nicht zugestimmt werden. Es wurden nämlich außer der Koleoptile von Kliem (1936) bei *Avena sativa* zwei, von Rösler (1928) und von Bugnon (1921) bei *Triticum vulgare* drei und von Bonnett (1935), ebenso von uns bei *Hordeum distichum* ebenfalls vier Blattanlagen gefunden. Die Bildung der jeweils nächsten Blattanlage wird also erst durch die Keimung eingeleitet.

Da die Sommergetreidearten relativ wenig Laubblätter entfalten, könnte in diesem Zusammenhang ein Vergleich mit den Wintervarietäten, die bekanntlich sehr viel mehr Laubblätter bis zum Eintritt in die reproduktive Phase hervorbringen, nicht nur von Interesse, sondern auch aufschlußreich sein. Bonnett (1936) gibt für *Purkof*, eine Wintervarietät des Weizens, vier Blattanlagen an. Nach Roth (1957) hat der Embryo des Winterweizens Sorte Dickkopf nur 3 Blattanlagen. Die gleiche Zahl stellten wir bei *Triticum spelta var. recens* fest und fanden bei den Winterformen von *Hordeum vulgare var. nigrum* und *var. giganteum* vier bzw. drei Blattanlagen. Die 4. Blattanlage bei *Hordeum vulg. var. nigrum* ist ebenso wie die bei ISARIA-Gerste erst als eine kleine durch wenige Teilungsschnitte eingeleitete Vorwölbung am Vegetationskegel erkennbar. Demnach ist die Zahl der Blattanlagen bei den Wintervarietäten gar nicht oder nur unwesentlich erhöht gegenüber den Sommervarietäten und steht in keiner Beziehung zu der Zahl der Blätter, die bis zum Übergang in die Ährenphase auswachsen. Es können zu diesem Zeitpunkt bis 10 und mehr Laubblätter gezählt werden bei gleichzeitigem Vorhandensein von 6 bis 8 Blattanlagen verschiedenster Entwicklungsstadien (Purvis, Bonnett 1936, Barnard).

Ferner muß — wie wir feststellten — darauf aufmerksam gemacht werden, daß Langtag-Getreidearten unter für sie nicht mehr als optimal anzusprechenden Tageslängen mit einer Erhöhung der Blattzahl reagieren. Die Potenz, auf unterschiedliche Tageslängen mit der Ausbildung einer verschieden großen Zahl von Blättern zu antworten, steckt also von vornherein in der Pflanze.

Die Sommergerste bildet im allgemeinen 7—9 Blätter in der Vegetationsperiode aus. Man müßte nun, wie RÖSLER mit Recht annimmt, erwarten, daß durchschnittlich auch nur 5 Blätter weiterhin angelegt werden, wenn schon drei im Embryo vorliegen. Unsere Präparationsergebnisse an verschieden alten Gerstenpflanzen zeigten aber, daß die Zahl der Blattanlagen höher ist als gefordert, und daß nicht alle Blattanlagen zu Laubblättern auswachsen. Die überzähligen Blattanlagen — gewöhnlich sind es zwei — finden sich wieder: einmal an der Basis der Ähre als sogen. „Kragen" ("collar leaf" nach BONNETT 1935) und zum anderen als wenig auffallender Gewebering am ersten Nodium über dem „Kragen". Der Kragen ist an etwa 2 cm langen Ähren immer noch deutlich abgesetzt und gut erkennbar (s. Abb. 2). In der Achsel des Kragens können ebenfalls Ährchen auftreten, die dann aber meist verkümmert und steril sind.

Abb. 2. (Erläuterungen im Text)

Es handelt sich also bei diesen Blattanlagen um die von PURVIS und GREGORY (1937) als „labil" bezeichneten Primordien. GREGORY und PURVIS (1938) nehmen in einer Hypothese an, daß diese durch Umweltfaktoren — beispielsweise nach Einwirkung niederer Temperatur (Vernalisation) — nicht mehr zu Laubblättern auswachsen, sondern daß durch eine Umstimmung die Ausbildung des Achselsprosses (Ährchenbildung) begünstigt wird. Die Tatsache, daß unter natürlichen Bedingungen in den Achseln der „Kragenblätter" Ährchen, wenn auch nur rudimentäre und sterile, auftreten können, spricht dafür, daß diese unter geeigneten Umweltseinwirkungen zur vollen Entwicklung gebracht werden können.

Wie schon darauf hingewiesen wurde, wird der Ablauf der Ährenentwicklung von der Tageslänge weitgehend beeinflußt. Die Ergebnisse einiger Versuchsserien mit unterschiedlicher Belichtungsdauer sind nachfolgend graphisch dargestellt. Es wurde dafür in bestimmten Zeitabständen die Zahl der entfalteten bzw. sichtbaren Blätter, ferner die Zahl der Blattanlagen sowie der Entwicklungsgrad des Vegetationskegels ermittelt. Abb. 3 gibt einen Gewächshausversuch mit einer durchschnittlichen Tageslänge von 13 Stdn. wieder, Abb. 4 und 5 zeigen Versuchs-

ergebnisse, die nach 18- bzw. 9-stündiger täglicher Lichteinwirkung erhalten wurden. Diese beiden Versuche liefen unter ausschließlichem Kunstlicht bei einer Strahlungsintensität von etwa 236 000 erg/cm² sec. Als Lichtquelle dienten Siccatherm-Infrarotstrahler. Die Raumtemperatur betrug im Mittel 23° C.

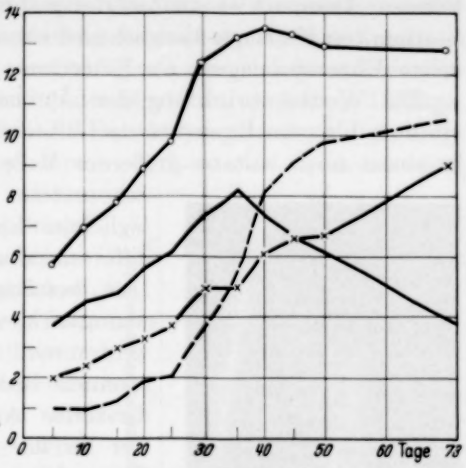


Abb. 3. Die Entwicklung des Vegetationskegels im 9-Stdn.-Tag. Auf der Ordinate sind aufgetragen: – – – Entwicklungsgrad des Vegetationskegels. ×–×–× Zahl der entfalteten Blätter. ——— Zahl der Blattanlagen. o——o Zahl der entfalteten Blätter + Blattanlagen

Der Verlauf der Kurvenscharen zeigt eindeutig, wie unter Langtagverhältnissen die Entwicklungsphasen viel rascher ablaufen, unter Kurztagbedingungen hingegen viel mehr Zeit erforderlich wird. Aus den graphischen Darstellungen geht weiter als recht bemerkenswerte Feststellung hervor, daß die höchste Zahl der Blattanlagen stets dann vorliegt, wenn am Vegetationskegel das Doppelringstadium ausdifferenziert ist. Danach werden keine weiteren Blattanlagen mehr gebildet. Bis zum Sichtbarwerden

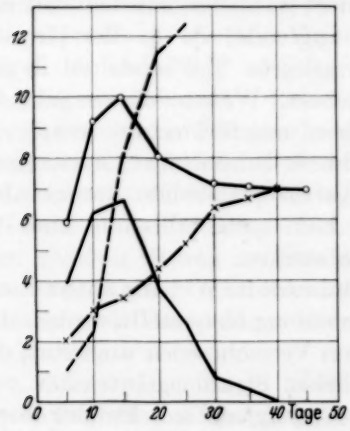


Abb. 4

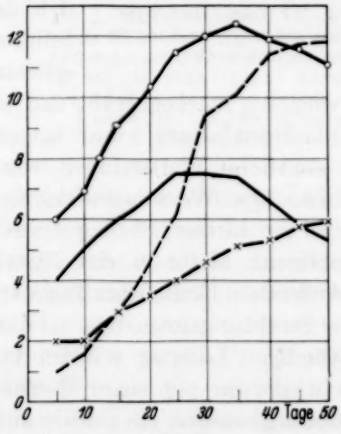


Abb. 5

Abb. 4 u. 5. Die Entwicklung des Vegetationskegels im 18-Stdn.-Tag und im 13-Stdn.-Tag. Auf der Ordinate sind aufgetragen: – – – Entwicklungsgrad des Vegetationskegels. ×–×–× Zahl der entfalteten Blätter. ——— Zahl der Blattanlagen. o——o Zahl der entfalteten Blätter + Blattanlagen

dieser entscheidenden Entwicklungsphase verstrichen im 18-Stdn.-Tag 15 Tage, im 13-Stdn.-Tag waren es 25 und im 9-Std.-Tag sogar 35 Tage.

Die Tageslänge ist also mittelbar dafür ausschlaggebend, wieviele der Blattanlagen in der Zwischenzeit noch zu Laubblättern auswachsen können. Demnach ist die Zahl der präformierten Stengelblätter in einem bestimmten Umfange variabel und kann bei vergleichend photoperiodischen Untersuchungen als Kriterium niemals herangezogen werden.

Die Weiterentwicklung der Ährchenprimordien vom Doppelringstadium bis zum Einsetzen der Blütendifferenzierung ist offensichtlich in einem noch weitaus größerem Maße von der Tageslänge abhängig. Schon eine Differenz von 5 Stdn. in der täglichen Lichtperiode kann die Blütendifferenzierung um Wochen hinausschieben. Dies bestätigt auch der Kurztag-Versuch, wenngleich der mit Vorbehalt bewertet werden muß, da eine 9-stündige Lichtperiode anomale Bedingungen für Langtagpflanzen darstellt. An den Vegetationskegeln, die hier in der Regel länger sind, weil mehr Primordien ausgegliedert werden, fällt besonders die ungleichmäßige Ausdifferenzierung auf. Abb. 6 zeigt eine 57 Tage alte embryonale Infloreszenz mit gleitenden Übergängen verschiedener Differenzierungsstadien. Für die Zuordnung eines bestimmten Entwicklungsstadiums legt man am besten den ältesten, d. h. am weitest ausdifferenzierten Teil der Infloreszenz zugrunde, da ja der jüngste, spitzenwärts gelegene Teil sehr bald in der Entwicklung steckenbleibt und verkümmert. Währenddessen geht die Laubblattentfaltung zwar langsam, aber ununterbrochen weiter, so daß sämtliche Blattanlagen, wie es Abb. 6 demonstriert, auswachsen können. Die Weiterentwicklung der Ährchenprimordien kommt aber infolge zu kurzer Photoperiode auch bald zum Stillstand und die Infloreszenz bleibt in der Blattscheide stecken.

Abb. 6. 57 Tage alter Vegetationskegel einer im Kurztag gewachsenen Gerste

Außer dem Einfluß der Tageslänge sollte auch die Wirkung unterschiedlicher Strahlungsintensität auf die Ährenbildung festgestellt werden. Im 18-stündigen Langtag wurden daher zwei Versuchsserien angesetzt, die eine wiederum mit einer durchschnittlichen Strahlungsintensität von 236000 erg/cm²sec, die andere mit ≈ 110000 erg/cm² sec. Parallel damit lief eine Serie im 9-Stdn.-Tag mit ebenfalls 236000 erg/cm²sec. Die gesamte hier eingestrahlte Energie war während der Versuchszeit also genauso groß wie die im Langtag-Versuch mit reduzierter Lichtintensität. Die Versuche liefen unter Ausschluß des Tageslichtes; der Versuchsraum und die Lichtquelle waren die gleichen wie im vorhergehenden Versuch.

Für eine übersichtlichere Darstellung der Vegetationskegel-Entwicklung wurden die Präparationsergebnisse der 3 Versuchsserien in einem Bilde vereinigt. Als Ausgangspunkt der Entwicklungsfolge wurde Stadium 2 zugrunde gelegt. Die Zeitangaben auf der Abszisse beginnen jeweils mit dem Tag, an dem dieses Stadium in den einzelnen Versuchsserien erreicht worden war (Abb. 7); sie differieren um 5 bzw. 15 Tage. Damit wird bereits die unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeit des Vegetationskegels bis dahin gekennzeichnet. Auffallend ist, daß auf die Weiterentwicklung bis zum Doppelringstadium die verschieden hohen Strahlungsintensitäten keinen wesentlichen Einfluß mehr haben. Kurve II steigt fast ebenso steil an wie I. Es scheint dieser Abschnitt der Ährenentwicklung nur von der Tageslänge abhängig zu sein (vgl. Kurve II mit III). Dagegen wird die weitere Ausdifferenzierung der embryonalen Infloreszenz sowohl von der Tageslänge als auch von der Lichtintensität gesteuert.

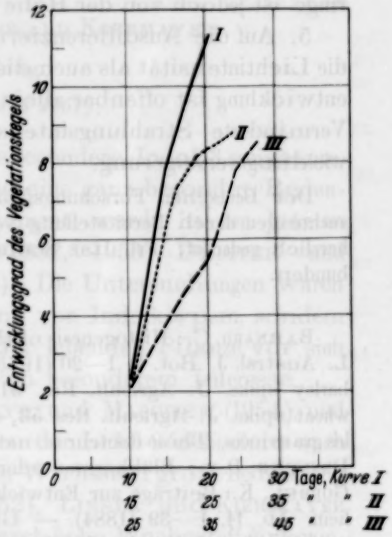


Abb. 7. Entwicklung des Vegetationskegels in Abhängigkeit von der Lichtintensität. Kurve I: 236 000 erg/cm² sec (18-Stdn.-Tag). Kurve II: ≈ 110 000 erg/cm²sec (18-Stdn.-Tag). Kurve III: 236 000 erg/cm²sec (9-Stdn.-Tag)

Die Blattentwicklung der Gersten unter reduzierter und voller Lichtintensität zeigt einen ziemlich gut übereinstimmenden Verlauf; zwar wird hier ebenfalls — wie beim Vegetationskegel — als Folge der geringeren Lichtintensität eine Entwicklungsverzögerung von 5 Tagen festgestellt, doch ist für die Zahl der entfalteten Blätter sowie die der Blattanlagen die Tageslänge ausschlaggebend. Die Pflanzen unter 9-stündiger Lichtperiode, die während der Versuchsdauer den gleichen Betrag an Strahlungsenergie erhielten wie die Pflanzen im 18-Stdn.-Tag mit reduzierter Strahlungsintensität, hatten mehr Blätter und Blattanlagen entwickelt.

Zusammenfassung

1. Die frühen Entwicklungsstadien der Gerstenähre werden an Hand von Mikrophotographien dargestellt.

2. Die Entwicklungsgeschwindigkeit ist eine Funktion der Tageslänge. Abnehmende Tageslänge verlangsamt allgemein den Ablauf, wirkt aber stärker auf die Differenzierungsvorgänge des Vegetationskegels ein, die dem Doppelringstadium folgen.

3. Die höchste Zahl der Blattanlagen ist erreicht, wenn das Doppelringstadium sich ausdifferenziert hat.

4. Versuche im 18-Stdn.-Tag bei verschieden hohen Strahlungsintensitäten (236000 erg/cm²sec und ≈ 110000 erg/cm²sec) zeigten, daß der Eintritt in die reproduktive Phase (Streckung des Vegetationspunktes) durch Herabsetzung der Lichtintensität verzögert wird. Die weitere Differenzierung des Vegetationskegels bis zum Erscheinen der Doppelringe ist jedoch von der Höhe der Intensität praktisch unabhängig.

5. Auf die Ausdifferenzierung der Ährchenprimordien haben sowohl die Lichtintensität als auch die Tageslänge einen Einfluß. Für die Blattentwicklung ist offenbar allein die Länge der Lichtperiode entscheidend. Verminderte Strahlungsintensität bedingt im Langtag nur eine Entwicklungsverzögerung.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft wird für die Förderung der Untersuchungen durch Bereitstellung von Apparaten und Gewährung einer Hilfskraft herzlich gedankt. Frl. Ilse Schirmer bin ich für ihre Mitarbeit besonders verbunden.

Literatur

Barnard, C.: Histogenesis of the inflorescence and flower of Triticum aestivum L. Austral. J. Bot. **3**, 1—20 (1955). — Bonnett, O. T.: The development of the barley spike. J. Agricult. Res. **51**, 451—457 (1935). — The development of the wheat spike. J. Agricult. Res. **53**, 445—451 (1936). — Bugnon, P.: La feuille chez les graminées. Thèse docteur sc. nat. Paris et mém. soc. Lin. Normandie **21** (1921).— Denffer, D. v.: Blühhormon oder Blühhemmung. Naturwiss. **37**, 296 (1950). — Goebel, K.: Beiträge zur Entwicklungsgeschichte einiger Infloreszenzen. Pringsheim Jb. **14**, 1—39 (1884). — Gregory, F. G., and O. N. Purvis: Studies in vernalisation of cereals. II. The vernalisation of excised mature embryos and of developing ears. Ann. of Bot., N.S. **2**, 237 (1938). — Helm, J.: Über Baueigentümlichkeiten der Infloreszenzen einiger tropischer Gräser. Flora (Jena) **129**, 53—93 (1934). — Kliem, F.: Vegetationspunkt und Blattanlage bei Avena sativa. Beitr. Biol. Pflanz. **24**, 281 (1936). — Minima, E. G., E. B. Igrizkaja u. P. P. Mazkewitsch: Einfluß der Feuchtigkeit des Bodens und der Luft sowie der Lufttemperatur auf die Ährchenbildung in der Weizenähre (russisch). Dokl. Akad. Nauk SSSR. **26**, 277—281 (1940). — Purvis, O. N.: An analysis of the influence of temperature during germination of the subsequent development of certain winter cereals and its relation to the effect of length of day. Ann. of Bot. **48**, 919—934 (1934). — Purvis, O. N., and F. G. Gregory: Studies in vernalisation of cereals. I. A comparative study of vernalisation of winter rye by low temperature and by short days. Ann. of Bot., N.S. **1**, 569 (1937). — Rösler, P.: Histologische Studien am Vegetationspunkt von Triticum vulgare. Planta (Berl.) **5**, 28—70 (1928). — Roth, I.: Histogenese und Entwicklungsgeschichte des Triticum-Embryos. Flora (Jena) **144**, 163—212 (1957). — Schuster, J.: Über die Morphologie der Grasblüte. Flora (Jena) **100**, 213—266 (1910). — Sharman, B. C.: Leaf and bud initiation in the gramineae. Bot. Gaz. **106**, 269—289 (1945). — The biology and developmental morphology of the shoot apex in the gramineae. New Phytologist **46**, 20—34 (1947).

Dr. Margarete Muschik, Bonn a. Rh.,
Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität

Planta, Bd. 49, S. 607—611 (1957)

Aus dem Biologischen Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke Aktiengesellschaft Linz a. d. Donau (Leiter: Hochschuldozent Dr. Hans Linser)

ZUR PHOTOLYSE VON INDOL-3-ACETONITRIL

Von

Elhusseiny Youssef und Oswald Kiermayer

Mit 1 Textabbildung

(Eingegangen am 29. Mai 1957)

Die Photolyse von Indolderivaten, insbesondere Indol-3-essigsäure, der bekanntlich in der Wuchsstofforschung eine ganz besondere Bedeutung als pflanzeneigener Wuchsstoff zukommt, wurde in den letzten Jahren eingehend studiert (Brauner 1952, 1953; Denffer und Fischer 1952; Fischer 1954; Mayr 1956). Die Untersuchungen waren nicht nur im Hinblick auf die Handhabung von Indolkörpern, sondern auch für ein tieferes Verständnis der in der lebenden Pflanze vor sich gehenden photolytischen Abbauprozesse von besonderem Interesse.

Wie Jones et al. (1952), Linser, Mayr und Maschek (1954) und Kefford (1955) zeigten, kommt nun neben der Indol-3-essigsäure auch dem Indol-3-acetonitril als pflanzeneigenem Wuchsstoff große Bedeutung zu, zumal Bentley und Housley (1952), Linser und Kiermayer (1956a) und Kiermayer (1956) eine äußerst hohe Wuchsstoffwirksamkeit dieser Substanz in *Avena*-Testen feststellen konnten. Es schien uns daher von Interesse auch bei Indol-3-acetonitril die Verhältnisse bei der Photolyse näher zu studieren.

Bei den nachfolgenden Versuchen kam eine Alkohol-Wasser-Lösung (1:1) von Indol-3-acetonitril* (IAN) mit einer Konzentration von 10^{-1}% zur Verwendung. Bei jedem Versuch wurden 3 kleine unbedeckte Schälchen, von denen jedes 2 cm³ der Versuchslösung enthielt (Schichtdicke der Lösung 0,3 cm), unter eine UV-Lampe gestellt. Die Lösungsoberfläche (2 cm³) wurde an jedem Schälchen markiert, so daß bei Verdunstung durch Zugabe eines Alkohol-Wasser-Gemisches stets wieder die ursprüngliche Konzentration eingestellt werden konnte. Als UV-Quelle diente eine Hg-Dampflampe im Dauerbetrieb (3,5 A) mit einem Brenner von 20 mm Durchmesser und 170 mm Länge, der sich in einem Abstand von 280 mm von den Schälchen befand. Die Proben wurden einer verschiedenen Bestrahlungsdauer ausgesetzt, nämlich 9, 18 und 27 Stunden.

* Das Präparat wurde im I. Organischen Laboratorium der Österreichischen Stickstoffwerke A.G. hergestellt.

Am Ende jeden Versuches wurden die 3 entsprechenden Proben zusammengeschüttet und von dieser Lösung 7 Chromatogrammspots aufgetragen. Von jedem dieser Spots wurde angenommen, daß er 75 γ von Indol-3-acetonitril enthält. Danach wurde absteigend mit einem Lösungsmittelgemisch Isopropanol-Wasser-Ammoniak (80:15:5) chromatographiert (VLITOS und MEUDT 1953), wobei die Chromatogramme (Papier: Whatman I) 5 Stunden gesättigt waren und 16 Stunden bei 22° C liefen.

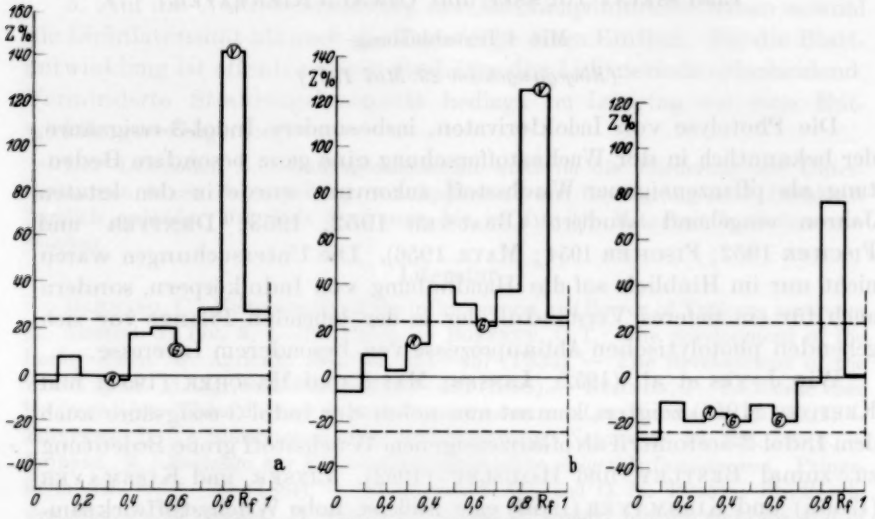


Abb. 1 a—c. Wuchsstoffwirksamkeit der verschiedenen Chromatogrammabschnitte eines mit UV-Licht bestrahlten Indol-3-acetonitrils im Zylindertest, sowie die mit p-Dimethylaminobenzaldehyd erhaltenen Farbreaktionen (in Kreisen: R = rot, G = gelb, V = violett); a nach 9stündiger, b nach 18stündiger, c nach 27stündiger Bestrahlungsdauer. Ordinate: perzentueller Längenzuwachs gegenüber den Kontrollen (Z %), Abszisse: R_f-Werte. [Die mittlere Abweichung des physiologischen Testes (Z % = ± 24) wurde als gestrichelte horizontale Linie eingezeichnet]

Nach der Trocknung wurden die 3 Chromatogramme mit Indolreagentien, nämlich Eisenchlorid-Perchlorsäure, p-Dimethylaminobenzaldehyd und dem Nitrose-Reagens besprüht bzw. ein Chromatogramm unter der UV-Analysenlampe ausgewertet. Die verbleibenden 3 Chromatogramme wurden in 10 gleich große Abschnitte zerteilt, mit dem gleichen Lösungsmittel eluiert (vgl. LINSER, MAYR und MASCHEK 1954) und biologisch in einem Koleoptilzylindertest (nach KIERMAYER 1956) getestet. Die Wuchsstoffwirksamkeit der Eluate wurde als Z % (perzentueller Längenzuwachs gegenüber den Kontrollen) angegeben.

Abb. 1 zeigt 3 Kurven bei denen auf der Ordinate die Wuchsstoffwirksamkeit in Z %, auf der Abszisse die R_f-Bereiche aufgetragen sind. Die Kurven wurden nach einer Bestrahlungsdauer von 9 Stunden (a) 18 Stunden (b) und 27 Stunden (c) erhalten. Die Farbspots, die mit

p-Dimethylaminobenzaldehyd erhalten wurden, sind in den Kurven mit ihren entsprechenden R_f-Werten in Form kleiner Kreise, in welchen außerdem der jeweilige Farbton angegeben ist, eingezeichnet.

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, sinkt die Wuchsstoffwirksamkeit im R_f-Bereich von 0,85 bis 0,87 (IAN-Zone) mit zunehmender Bestrahlungsdauer stark ab (von 142% nach 9 Stunden auf 126% nach 18 Stunden und 77% nach 27 Stunden). Es scheint somit IAN durch das UV-Licht *teilweise* zerstört zu werden, wobei das Ausmaß der Zersetzung proportional ist der Bestrahlungsdauer. Diese Tatsache

Tabelle 1. *Farbreaktionen und Fluorescenzfarben eines 27 Stunden mit U.V.-Licht bestrahltem Indol-3-acetonitril auf dem Papierchromatogramm*

R_f-Bereich	Fluorescenz	Farbreaktion			
		Eisenchlorid-Perchlorsäure		p-Dimethylamino-benzaldehyd	
		Tageslicht	UV	Tageslicht	UV
0,2—0,3	blau (0,29)	—	—	—	—
0,3—0,4	blau (0,38)	rot (0,31)	rot mit blauem Ring (0,31)	rot (0,31)	—
0,4—0,5	—	—	—	gelb (0,42)	—
0,5—0,6	blau (0,58)	—	—	—	—
0,6—0,7	gelb (0,63) blau (0,68)	—	—	gelb (0,62)	gelb (0,62)
0,7—0,8	gelb (0,74)	—	gelb (0,71)	—	—
0,8—0,9	—	—	hellgrün (0,83)	—	—

konnte auch an Hand der Farbspots, die für IAN erhalten wurden, festgestellt werden: Diese wurden um so kleiner und heller je länger die Bestrahlungsdauer war. Bei 27 Stunden Bestrahlungsdauer trat kein Farbspot mehr in Erscheinung. Allerdings zeigte sich hier nach Besprühung mit Eisenchlorid-Perchlorsäure im UV-Licht noch ein hellgrüner Spot (vgl. Linser und Kiermayer 1956b). Es ist überraschend, daß selbst nach einer Bestrahlungsdauer von 27 Stunden IAN wie Abb. 1c zeigt, keineswegs vollständig zerstört wird, sondern noch eine ausgeprägte Wuchsstoffwirksamkeit zeigte, zumal Mayr (1956) (bei gleicher UV-Quelle als die hier verwendete) feststellte, daß Indol-3-essigsäure in 2%igem Alkohol nach 30 Minuten, in 96%igem Alkohol nach 3 Stunden quantitativ zerstört wird. Es scheint deshalb, daß Indol-3-acetonitril durch UV-Licht weniger schnell der photolytischen Zersetzung unterliegt als Indol-3-essigsäure. Bei Bestrahlung der Chromatogramme mit der UV-Analysenlampe konnte eine große Anzahl fluorescierender Spots, die als Photolyseprodukte des IAN auftraten, beobachtet werden. Mit dem Eisenchlorid-Perchlorsäure-

Reagens und mit p-Dimethylaminobenzaldehyd erschien in einem R_f-Bereich von 0,31—0,33 ein roter Spot. Ferner konnte ein stark gelber Spot mit einem R_f-Wert von 0,60—0,63, bei 27 Stunden bestrahlten Chromatogrammen, ein weiterer gelber Spot mit einem R_f-Wert von 0,42 beobachtet werden. Die genannten gelben Spots zeigten sich jedoch nur mit dem p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens, gaben dagegen keine Reaktion mit Eisenchlorid-Perchlorsäure. Die, den erwähnten Farbspots entsprechenden eluierten Chromatogrammzonen zeigten keine Wuchsstoffwirksamkeit. Tabelle 1 zeigt die Spots, die bei Betrachtung eines Chromatogrammes (IAN, 27 Std. UV-Bestrahlung) unter dem UV-Licht sichtbar wurden, ferner auch die Spots, die nach Behandlung der Chromatogramme mit dem p-Dimethylaminobenzaldehyd-Reagens auftraten.

Wie oben beschrieben, trat mit den Indolreagentien bei einem R_f-Wert von 0,31—0,33 ein roter Spot in Erscheinung. Nachdem der Spot den gleichen Farbton sowie den gleichen R_f-Wert als eine synthetische Indol-3-carbonsäure[1] aufwies, scheint es sehr wahrscheinlich, daß es sich hierbei um dieselbe Substanz handelt. Als photolytisches Zersetzungsprodukt von Indol-3-acetonitril konnte somit neben einigen schwach fluorescierenden und 2, mit p-Dimethylaminobenzaldehyd gelb gefärbten Substanzen *Indol-3-carbonsäure identifiziert werden.*

Abschließend sei noch erwähnt, daß nur nach einer Bestrahlungsdauer von 18 Stunden in einem R_f-Bereich von 0,40—0,60, der dem von Indol-3-essigsäure entspricht, geringe Wuchsstoffwirksamkeit, jedoch kein Farbspot beobachtet werden konnte. Es ist vielleicht möglich, daß während der Photolyse des IAN auch kleine Mengen an Indol-3-essigsäure gebildet worden sind. Daß eine teilweise Umwandlung von IAN in Indol-3-essigsäure auf enzymatischem Wege möglich ist, konnten Stowe und Thimann (1954) an Hand von Versuchen, bei welchen *Avena*-Koleoptilabschnitte in IAN-Lösungen eingelegt wurden und diese eine Umwandlung von IAN in Indol-3-essigsäure bewirkten, zeigen.

Summary

Alcohol-water solutions of 3-indoleacetonitrile were exposed to ultraviolet light for different time intervals. The products of the auxin destruction were separated on paper chromatograms and tested biologically. Indoleacetonitrile was found to be partially destroyed with ultraviolet radiation. The rate of the auxin destruction increased with the time of illumination. However after 27 hours of illumination the auxin was not completely destroyed. Among the products of the auxin destruction, indole-3-carboxylic acid was identified.

[1] Die Indol-3-carbonsäure wurde im I. Organischen Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke AG hergestellt.

Literatur

BENTLEY, J. A., and S. HOUSLEY: Biological activities of 3-indolylacetaldehyde and 3-indolylacetonitrile. J. of Exper. Bot. **3**, 393 (1952). — BRAUNER, L.: Über pH-Veränderungen bei der Photolyse des Heteroauxins. Naturwiss. **39**, 282 (1952). Untersuchungen über die Photolyse des Heteroauxins. Z. f. Bot. **41**, 291 (1953). — GORDON, S. A., and R. P. WEBER: Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiol. **26**, 192 (1951). — DENFFER, D. v., u. A. FISCHER: Papierchromatographischer Nachweis des β-Indolaldehyds in photolytisch zersetzter Indolessigsäure-Lösung. Naturwiss. **39**, 549 (1952). — FISCHER, A.: Über die papierchromatographische und papierelektrophoretische Trennung von Indolderivaten. Planta (Berl.) **43**, 288 (1954). — JONES, E. R. H., H. B. HENBEST, G. F. SMITH and J. A. BENTLEY: 3-Indolylacetonitrile: a naturally occuring plant growth hormone. Nature (Lond.) **169**, 485 (1952). — KEFFORD, N. P.: The growth substances separated from plant extracts by chromatography. J. of Exper. Bot. **6**, 129 (1955). — KIERMAYER, O.: Eine einfache Arbeitsweise für den Koleoptilzylindertest. Planta (Berl.) **47**, 527 (1956). — LINSER, H., u. O. KIERMAYER: (a) Chemische Konstitution und Zellstreckungswirkung verschiedener Stoffe. II. Mh. Chem. **87**, 708 (1956). (b) Fluoreszenzanalytischer Nachweis von Indolkörpern insbesondere Indol-3-acetonitril auf Papierchromatogrammen. Biochim. et Biophysica Acta **21**, 382 (1956). — LINSER, H., H. MAYR u. F. MASCHEK: Papierchromatographie von zellstreckend wirksamen Indolkörpern aus *Brassica*-Arten. Planta (Berl.) **44**, 103 (1954). — MAYR, H.: Zur Photolyse von Indol-3-essigsäure bei papierchromatographischen Arbeiten. Planta (Berl.) **46**, 512 (1956). — STOWE, B. B., and K. V. THIMANN: The paper chromatography of indole compounds and some indole-containing auxins of plant tissues. Arch. of Biochem. a. Biophysics **51**, 499 (1954). VLITOS, A. J., and W. MEUDT: The role of auxin in plant flowering I. A quantitative method based on paper chromatography for the determination of indole compounds and of 3-indoleacetic acid in plant tissues. Contrib. Boyce Thompson Inst. **17**, 197 (1953).

Dr. ELHUSSEINY YOUSSEF, Dr. OSWALD KIERMAYER,
Biologisches Laboratorium der Österreichische Stickstoffwerke A.G.
Linz a. d. Donau 2, Haag 19 (Österr.)

Planta, Bd. 49, S. 612—661 (1957)

Aus der Forstlichen Bundesversuchsanstalt Mariabrunn, Außenstelle für Lawinenvorbeugung bei der forsttechn. Abteilung für Wildbach- und Lawinenverbauung, Sektion Innsbruck

STANDORTSKLIMA, WASSERBILANZ UND CO_2-GASWECHSEL JUNGER ZIRBEN (PINUS CEMBRA L.) AN DER ALPINEN WALDGRENZE

Von

WALTER TRANQUILLINI

Mit 14 Textabbildungen

(Eingegangen am 25. März 1957)

Einleitung

Wie wir heute sicher wissen, vermögen immergrüne Nadelhölzer in Tallagen bis zum Eintritt stärkerer und anhaltender Kälte erheblich zu assimilieren. So betrug z. B. die CO_2-Nettoausbeute einer Fichte an einem milden Dezembertag noch $^1/_3$ der eines produktiven Sommertags (PISEK und TRANQUILLINI 1954). Erst nach Einbruch strengen Frostes fiel die Fichte in eine, von außen her nicht leicht störbare Winterruhe, die bis zum Eintreten länger dauernder Erwärmung anhielt. In dieser Zeit ruhte der Gaswechsel fast völlig (ZELLER 1951), auch wenn die Tagestemperatur den Gefrierpunkt überschritt[1].

Grundsätzlich ähnliches Verhalten — Rückgang der herbstlichen Assimilation unter dem Einfluß geringen Frostes und Ruhen des Gaswechsels im Hochwinter — fand CARTELLIERI (1935) bei Zirben an der Waldgrenze in 1900 m, nur daß hier die Winterruhe entsprechend der Höhe schon an der Wende Oktober—November eintrat und länger anhielt.

Diese eindeutigen Ergebnisse widerlegen die Resultate mancher älterer Untersuchungen, welche Assimilation bei tiefen Temperaturen im Hochwinter zu beweisen glaubten (HENRICI 1921, ZACHAROWA 1929. Vgl. WALTER 1934, S. 185).

Die Abnahme der Assimilation im Herbst, ihre Zunahme im Frühjahr sowie die Länge und Tiefe der Ruheperiode dürften vor allem vom Temperaturklima bestimmt werden. Doch ist dabei die Frage noch völlig offen, *wie* die Temperatur den winterlichen CO_2-Gaswechsel im

[1] Nach ZELLER (1951) war jedoch die Winterruhe der Fichte nicht absolut. Im milden Winter konnten wärmere Tage zwischen Kälteperioden zu schwachem Stoffgewinn ausgenützt werden. Ebenso zeigten Fichtenzweige, die im Freien keinen Gaswechsel aufwiesen, nach Übertragung ins warme Zimmer sofort lebhaften Gasaustausch, vor allem stärkere Atmung, während die Assimilation weniger anstieg.

einzelnen beeinflußt. Diese Frage kann weder aus den stichprobenartig vorgenommenen Messungen PISEKs und TRANQUILLINIs, noch aus den mit dem Ålvik-Verfahren ermittelten Tagesbilanzen ZELLERs ausreichend geklärt werden.

Der jahreszeitliche Verlauf der Assimilation und Atmung wird jedoch nicht allein von der Luft- bzw. Pflanzentemperatur gesteuert. Auch die Strahlung und die Schneebedeckung, der Bodenfrost und die Wasserbilanz können unmittel- oder mittelbar sicherlich entscheidende Bedeutung erlangen.

Schließlich ist die Möglichkeit der Beteiligung einer inneren Rhythmik, wie sie PISEK und SCHIESSL (1947) beim Jahresgang der Frosthärte nachgewiesen haben, auch hier nicht zu vergessen. Dem Wechsel zwischen frosthartem und enthärtetem Zustand liegen physikalisch-chemische Veränderungen des Plasmas zugrunde (KESSLER und RUHLAND 1938), die nicht ohne Einfluß auf Assimilation und Atmung bleiben dürften (MONTFORT und HAHN 1950).

Weiters bedarf noch der Klärung, welche Faktoren die mehrfach nachgewiesene reversible Schwankung des Chlorophyllspiegels (STÅLFELT 1927, ZACHAROWA 1929, ZELLER 1936) verursachen, und ob letztere beim herbstlichen Rückgang und frühjährlichen Wiederanstieg der photosynthetischen Leistung eine Rolle spielt.

Die Überprüfung der mysteriösen Angaben über Zerfall und Regeneration der Chloroplasten (SCHMIDT 1936, ZACHAROWA 1929, ZELLER 1951), über „diffuses" Chlorophyll und dergleichen mehr, ist eine Aufgabe für sich, die hier außer Betracht bleibt.

Die eben umrissenen Fragen wurden an Jungzirben bearbeitet, die knapp oberhalb der natürlichen Waldgrenze spontan aufgegangen waren. Die Arbeit zeigte Erfolg, weil es gelang, den CO_2-Gaswechsel und die wichtigsten für diesen ausschlaggebenden Faktoren fast den ganzen Winter hindurch an Ort und Stelle kontinuierlich zu registrieren. Die Voraussetzung hierfür bot die ökologische Station „Waldgrenze" der Forschungsstelle für Lawinenvorbeugung, die den ganzen Winter offen gehalten wurde.

I. Standort und Versuchsobjekte

Im Jahre 1953 errichtete die Forschungsstelle für Lawinenvorbeugung eine bioklimatische Freilandstation auf einer Waldlichtung am Westhang des in NS-Richtung verlaufenden Gurglertales (inneres Ötztal, Tirol) oberhalb des Weilers Poschach in 1940 m Seehöhe, um mit umfassenden Versuchen zu beginnen, die den Einfluß des Standortes auf das Leben der verschiedenen Holzarten klären sollen (AULITZKY 1954, TRANQUILLINI 1955). Schon im darauffolgenden Jahr wurde die Station bedeutend erweitert und zu einem Stationsnetz entwickelt, das den

Hang von seiner Sohle bis zur Baumgrenze querte (AULITZKY 1955). Dabei verlegte sich der Schwerpunkt der Messungen in den Bereich der Waldgrenze (2070 m). Gleich oberhalb der Waldkrone, die an dieser Stelle durch mächtige Wetterzirben gebildet wird, unterbricht eine etwa 25 m breite glaziale Talsohle das Hangprofil. Auf dieser Geländestufe wurde die Station „Waldgrenze" errichtet (Abb. 1).

a b

Abb. 1 a u. b. Die ökologische Station „Waldgrenze" (2070 m) a im Sommer und b im Winter

Die vorherrschende Holzart im Stationsbereich ist die für die zentralalpine Waldgrenze charakteristische, äußerst winterharte Zirbe (*Pinus Cembra* L.), die sich bis in 2230 m Höhe auf *Vaccinium uliginosum*reichem Rohhumusboden lebhaft verjüngt, besonders auf dem NW-Hang eines Geländegrabens, der sog. „Bärrinne", die nördlich der Station zu Tale zieht.

Die physiologischen und klimatischen Messungen wurden im engeren Umkreis dieser Station durchgeführt, so daß Schlauch- und Kabelverbindungen zwischen den Versuchspflanzen am natürlichen Standort und den Rigistrierinstrumenten, die in 2 Baracken untergebracht waren, möglichst kurz (maximal 50 m) gehalten werden konnten. Der geringe Aktionsradius genügte, um eine ausreichende Anzahl geeigneter Versuchsobjekte aufzufinden, und erleichterte im Hochwinter die Wartung der Meßanlage.

Im Oktober 1954 wurden 3 gesunde, rund 10 cm hohe Jungzirben ausgewählt, an denen der Gaswechsel im Winter geprüft werden sollte. Eine stand auf der horizontalen Verebnung (H_2), eine am NW-Abfall zur Bärrinne (N_2) und die dritte am Westabfall zum Haupthang (W_1). Diese 3 Zirben wurden, nachdem die Versuche beendet waren, vermessen und ihr Alter und Trockengewicht bestimmt (Tabelle 1).

Tabelle 1

	Zirbe				
	H_2	H	N_2	W_1	W
Höhe über dem Boden (cm)	13,0	148,0	12,1	11,6	184,0
Höhenzuwachs des letzten Jahres (cm)	1,5	7,0	1,5	1,6	4,5
Länge der Hauptwurzel (cm)	16,0	—	13,0	16,0	—
Alter (Jahre)	7	25	7	6	53
Trockengewicht (g)					
Stamm	0,533	—	0,830	0,538	—
Nadeln (letzter Jahrgang)	0,178	—	0,272	0,196	—
Nadeln (gesamt)	1,027	—	1,765	0,787	—
Wurzeln	0,313	—	0,485	0,169	—
Gesamt	*1,873*	—	*3,080*	*1,494*	—
Hanglinie:					
Neigung	12°		27°	31°	
Exposition	W		NNE	W	
Vegetation	Übergang von Arctostaphyletum uva ursi in Loiseleurietum		Loiseleurietum cetrariosum mit viel Empetrum	Vaccinietum uliginosi myrtillosum	

Die Pflanzen sind ungefähr gleich alt, gleich groß, mit Ausnahme von N_2 noch unverzweigt und gleichartig bewurzelt. In der Trockengewichtsproduktion sowie im Nadelzuwachs übertrifft allerdings die Nordzirbe die beiden anderen bedeutend.

In unmittelbarer Nähe dieser Hauptversuchsobjekte wurden 3 gleichartige Vergleichspflanzen ausgewählt, an denen die Nadeltemperatur außerhalb der Assimilationsküvetten gemessen werden sollte.

Da alle 6 Zirben im Dezember unter Schnee kamen und erst im Mai wieder ausaperten, wurde der Gaswechsel und die Temperatur in der Zwischenzeit auch an Zweigen zweier älterer, rund $1^1/_2$ m hoher Jungzirben (H und W) untersucht, die in der Nähe der Zirben H_2 bzw. W_1 standen und deren Gipfeltriebe stets über die Schneedecke herausragten. Sie sind zwar wesentlich älter als die erstgenannten Objekte (Tabelle 1), waren diesen jedoch von allen benachbarten Jungzirben, die im Hochwinter teilweise der Schneebedeckung entbehrten, noch am ähnlichsten.

Auf die Bestimmung ihres Trockengewichtes und der Wurzellänge wurde verzichtet.

II. Methodik

a) Die Messung des CO_2-Gaswechsels. Über den oberirdischen Teil der Versuchspflanzen wurden zylindrische Küvetten aus dünnem Cellon gestülpt, in denen die Nadelbüschel bequem Platz fanden (Abb. 2). Die Wände der Küvetten waren zum Schutz gegen Schneedruck durch Plexiglasringe und -stäbe versteift. Die

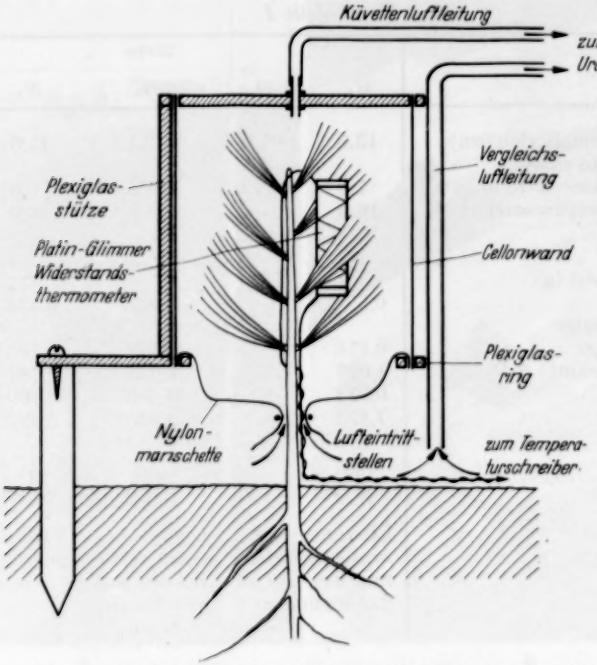


Abb. 2. Schnitt durch die Assimilationsküvette am Standort

obere Öffnung diente zur Luftableitung, die untere zum Einschieben der Nadeln und des Platinthermometers. Die Luft konnte nur durch die untere Öffnung, die nachträglich durch eine Nylonmanschette verengt wurde, in die Küvette eintreten. In unmittelbarer Nähe dieser Eintrittsöffnung endete auch die Parallelleitung für die Vergleichsluft. Die Durchströmung der Küvetten und Vergleichsluftleitungen besorgten 6 elektrische Membranpumpen (Gf 16 der Fa. Maihak), die in einem Kasten an der Baracke angebracht waren. Die angesaugte Luft wurde gleich hinter den Küvetten in U-Röhren mit Silikagel getrocknet[1] und gelangte durch PVC-(Kunststoff-)Schläuche zu den Pumpen, die sie in den Gasumschalter weiterdrückten. Dieser verband die 6 Leitungen hintereinander in Abständen von 1 min mit dem CO_2-Analysator (*Uras*).

Der *Uras* registrierte in Minutenabstand den CO_2-Gehalt der Luftproben nach dem bekannten Prinzip der Ultrarotabsorption (EGLE und ERNST 1949). Die

[1] Versuche an Stelle von Silikagel $CaCl_2$ als Trocknungsmittel zu verwenden (BOSIAN 1955) scheiterten daran, daß sich schon nach kurzer Zeit im Rohr ein fester Pfropfen bildete, der die Leitung verstopfte.

von den Pflanzen absorbierte bzw. abgegebene CO_2-Menge ist gleich der Differenz des CO_2-Gehaltes jeweils zweier Luftströme. Zu ihrer Berechnung muß der Meßbereich des *Uras* in Vol.-% CO_2, die Strömungsmenge in der Zeiteinheit und die Menge der assimilierenden bzw. atmenden Pflanzenteilen bekannt sein. Die Empfindlichkeit des *Uras* betrug in unseren Versuchen rund 0,0004 Vol.-% CO_2 je Skalenteil des Anzeigegerätes. Sie wurde täglich durch Eichung mit Gasen bekannter Kohlensäurekonzentrationen kontrolliert. Die Strömungsmenge hielten wir möglichst konstant auf 30 l Luft/Std. Ihre Messung erfolgte mehrmals am Tage mittels Rotameter. Die abgelesenen Werte wurden auf 760 mm Druck und 20°C umgerechnet und danach die Pumpeneinstellung korrigiert. Als Bezugseinheit für den CO_2-Gaswechsel wählten wir das Trockengewicht der Nadeln.

Während *Uras*, Schreiber, Spannungskonstanthalter, Gasumschalter und Rotameter über den ganzen Versuchszeitraum bis auf kleine Störungen, die bei Vorhandensein von Ersatzteilen rasch behoben werden konnten, klaglos funktionierten, ergaben sich im Luftleitungssystem unerwartete Schwierigkeiten, vor allem durch die niedrige Außentemperatur und die Schneebedeckung der Küvetten:

1. Die Überwärmung der Nadeln in der Küvette, die im Herbst durch Vorschalten von Wärmeschutzscheiben (BG- und KG-Filter der Fa. Schott) wirksam vermindert werden konnte (Tranquillini 1954), machte sich im Winter trotz Verwendung solcher wieder stärker bemerkbar. Die Wärmeabfuhr durch die schwach bewegte Luft in der Küvette kommt zu dieser Jahreszeit trotz der verminderten Einstrahlung nicht annähernd an jene heran, welche der freien Atmosphäre ausgesetzte Pflanzenorgane durch die kalte bewegte Luft erfahren[1]. Überdies gelangte die vom Schnee reflektierte Strahlung von allen Seiten zur Küvette, so daß die Wärmefilterplatte, die nur die direkte Einstrahlung schwächt, relativ unwirksam blieb. Das Problem des unnatürlichen Küvettenklimas kann daher meines Erachtens nur dadurch gelöst werden, daß man die Strömungsgeschwindigkeit in den Kammern bedeutend erhöht. Versuche in dieser Richtung mit einem starken GKS-Gebläse der Fa. Boepple sind im Gange[2].

2. Die Ansaugöffnung der Küvetten und Vergleichsluftleitungen befand sich unmittelbar über der Bodenoberfläche. Infolge der Bodenatmung lagern auf ihr CO_2-reiche Luftschichten, die normalerweise von der Luftströmung wieder rasch fortgetragen werden. Verhindert jedoch Bodenbewuchs der Luftbewegung zeitweise den Zutritt zur Bodenoberfläche, so wird der CO_2-Gehalt der angesaugten Luftproben unruhig (vgl. auch Reinau 1954), die Auswertung der *Uras*-Kurven schwierig und unexakt. Versuche, die Luft von oben her durch die Küvette zu leiten, scheiterten an der Unmöglichkeit, die Öffnung für den Stengel der Pflanze absolut dicht zu halten, ohne diesen zu verletzen oder zu quetschen. Weiters werden die Ansaugstellen schon bei geringem Schneefall zugedeckt. Die Bodenatmungskohlensäure, die sonst von der Luftströmung rasch verteilt wird, gelangt in die Leitungen, der CO_2-Gehalt steigt stark über den gewohnten Luftwert an.

[1] Auch Nuernbergk (1953) betonte, daß die hohen Blattemperaturen in Gewächshäusern weniger auf der geringen Durchlässigkeit des Gewächshausglases für langwellige ultrarote Strahlen beruhen, sondern auf der fehlenden Luftbewegung und der dadurch behinderten Wärmekonvektion.

[2] In Küvetten eingeschlossene Pflanzenteile stehen bezüglich ihrer Belüftung, CO_2-Versorgung und ihres Feuchteklimas unter mehr oder weniger unnatürlichen Verhältnissen, wodurch Spaltöffnungszustand, Transpiration und Wasserbilanz und daher auch (mittel- wie unmittelbar) die Assimilation beeinflußt wird. Das Küvettenmilieu wird um so natürlicher, je rascher der Kammerluftinhalt erneuert wird und je näher die Luftbewegung in der Küvette an die im Freien durchschnittlich herrschende herankommt.

Das ist belanglos solange in ein Leitungspaar gleichviel bodenbürtiges CO_2 eindringt, weil die Differenz der CO_2-Gehalte in diesem Falle allein auf die Tätigkeit der in der Küvette eingeschlossenen Pflanze zurückgeht; nur die CO_2-Basis ist erhöht. Kommunizieren aber Küvettenleitung und Vergleichsluftleitung mit verschieden großen Hohlräumen unter der Schneedecke, also auch mit verschieden großen Teilen der atmenden Bodenoberfläche, so beruht die CO_2-Differenz der beiden Gasproben nicht mehr allein auf der Tätigkeit der Pflanze, sondern zum Teil auf der verschiedenen Bodenatmung. Gelangt nun zufällig in die Küvettenleitung mehr bodenbürtiges CO_2 als in die Vergleichsluftleitung, so wird eine „Scheinatmung", im umgekehrten Fall eine „Scheinassimilation" verzeichnet, die man jedoch von der wirklichen Assimilation leicht dadurch unterscheiden kann, daß sie auch bei Verdunklung anhält.

3. Im Winter bildeten sich häufig in den Luftleitungen auf dem Weg von der Küvette bis zum Silikagelrohr durch Gefrieren von Kondenswasser Eispfropfen, die die Luftförderung erschwerten. Zunächst konnte der steigende Leitungswiderstand durch höhere Pumpenleistung überwunden werden, schließlich aber schloß sich die Leitung völlig. Das Auffinden der Störstelle kostete dann viel Zeit, die Leitungen mußten aus dem Schnee ausgegraben und aufgetaut werden. Dadurch wurde wieder die natürliche Schneebedeckung gestört. Die Pumpen wurden im Laufe des Winters so stark beansprucht, daß sie gegen Ende des Versuchszeitraumes unregelmäßig arbeiteten und schließlich der Reihe nach ausfielen. Das Programm mußte eingeschränkt werden, die Auswertung der Messungen wurde schwierig, da sich die Änderungen der Strömungsmengen auch durch mehrere Ablesungen am Tage nicht erfassen ließen, jedoch direkt proportional in die Assimilations- und Atmungswerte eingehen[1].

All diese versuchstechnischen Mängel wurden erst im Laufe der Arbeit erkannt, weshalb bei der Auswertung der zahlreichen Messungen scharfe Kritik notwendig war. Längere Registrierungsperioden (z. B. die Messungen des Gaswechsels unter der Schneedecke) mußten nachträglich verworfen werden.

b) Die Messung der Luft- und Nadeltemperatur. Neben der in Wetterstationen üblichen Aufzeichnung der Lufttemperatur durch einen Thermographen, der im Zentrum der Station in einer meteorologischen Hütte in 2 m Höhe über dem Erdboden aufgestellt war, wurde die Nadeltemperatur der 3 in Küvetten eingeschlossenen Versuchspflanzen und der 3 freistehenden Vergleichspflanzen registriert. Als Temperaturfühler verwendeten wir einen nur 25 μ dicken Platindraht, der auf dünner Glimmerfolie aufgewickelt und durch farblosen Lack isoliert war. Die Länge des Drahtes war so bemessen, daß sein Widerstand bei 0°C genau 50,0 Ω betrug. Auf diese Weise hergestellte Thermometer sind im Gegensatz zu frei im Nadelbüschel verspannten blanken Platindrähten (TRANQUILLINI 1955) sehr stabil; sie überstanden alle unversehrt den Winter. Dieses „Platinglimmerwiderstandsthermometer" wurde zwischen die Nadeln der Versuchspflanzen so eingeschoben (Abb. 2), daß es guten Kontakt mit ihnen hatte. Die am Kreuzspulschreiber angezeigte Temperatur weicht vom tatsächlichen Temperaturmittel aller Nadeln des Triebes, das sich durch viele Einzelmessungen mit einem strahlungsunempfindlichen Thermoelement fallweise genau bestimmen läßt, maximal um 2°C ab.

c) Die Messung der Bodentemperatur. Da bei diesen Messungen kein Strahlungsfehler auftreten kann, das Thermometer jedoch gegen mechanische Einflüsse stabil sein muß, bewährten sich als Temperaturfühler elektrische Widerstands-

[1] Die Wichtigkeit, die Strömungsmenge absolut konstant zu halten erfordert ständige Kontrolle. Es liegt daher nahe, diese Kontrolle einem automatischen Regler zu überlassen. Eine derartige Anlage wird derzeit bei uns entwickelt.

thermometer aus isoliertem Nickeldraht (100 Ω bei 0°C), die von einem Bleimantel umgeben waren. Die Thermometer wurden in verschieden temperiertem Wasser auf einen Kreuzspulschreiber bzw. auf ein Kreuzspulablesegerät geeicht und dann im Boden vergraben. Die Bodentemperatur wurde in der Nähe der Zirben H_2 und N_2 unmittelbar unter der Bodenoberfläche und in 10 cm Tiefe registriert, bei der Zirbe H_2 auch noch in 50 und 100 cm Tiefe mehrmals am Tage abgelesen. Diese Meßanordnung gestattete, den Temperaturverlauf und die Temperaturschichtung im Boden, in dem die Versuchspflanzen wurzelten, genau zu verfolgen. Lagen die gemessenen Werte jedoch nur wenige Zehntel Grade unter 0°, konnte die Frage, ob das Wasser im Boden gefroren war bzw. ob die Pflanzenwurzeln noch Wasser aus dem Boden aufzunehmen in der Lage waren, nicht eindeutig entschieden werden. Meßkörper, die das Frieren des Bodenwassers verläßlicher anzeigen (z. B. durch plötzliche Erhöhung der elektrischen Bodenleitfähigkeit, Verminderung der Dielektrizitätskonstante) standen noch nicht zur Verfügung.

d) Die Globalstrahlung (Sonnen- und Himmelsstrahlung) wurde im Zentrum der Station in Nähe der Zirbe H_2 sowie bei den Versuchspflanzen N_2 und W_1 von horizontal exponierten Sternpyranometern nach LINKE-SAUBERER mittels Drehspulschreiber registriert (DIRMHIRN 1954). Die „Sterne" wurden mehrmals im Versuchszeitraum mit einem nur für diesen Zweck verwendeten Galvanometer in cal/cm² · min auf die Schreiberskala geeicht. Im Gegensatz zu den Photozellen, die wie ja mehrfach zugegeben wurde, ihre Empfindlichkeit nicht nur in langen, sondern auch in kürzesten Zeiträumen beträchtlich verändern, besonders wenn sie stark oder dauernd belichtet werden (TURNER 1957), zeigten die Sternpyranometer bei allen Eichungen größte Konstanz der Empfindlichkeit. Dieser Umstand bewog mich, von den in der Pflanzenphysiologie bisher fast ausschließlich verwendeten elektrischen Photozellen abzugehen und an Stelle des Lichtes die Strahlung zu messen. Die Sternpyranometer sprechen allerdings im Gegensatz zu den Photozellen auch auf den infraroten Spektralbereich der Strahlung bis 3,0 μ an. Dadurch ist das Verhältnis der Licht- zur Strahlungsanzeige von der Bewölkung und vom Sonnenstand abhängig, indem starke Infrarotstrahlung an wolkenlosen Tagen sowie bei niedrigem Sonnenstand zu einer Überhöhung der Strahlungsgröße gegenüber der Lichtintensität führt. Im Mittel entspricht an unserem Standort in 2000 m Höhe 1 cal/cm² · h rund 1300 Lux-Std (TURNER 1957). Auch die größten Abweichungen von dieser Beziehung sind für ökologische Vergleiche der Strahlungswerte mit der Assimilation belanglos.

e) Der Niederschlag (Regen und Schnee) wurde mit einem Schnee-Regenschreiber nach dem Waageprinzip System Hellmann (Auffangfläche 500 cm²) registriert, die *Schneehöhe* im Zentrum der Station, sowie am Standort der Versuchspflanzen durch tägliche Ablesungen von Schneepegeln bestimmt.

f) Die Messung des Wassergehaltes und osmotischen Wertes. Zu mehreren Terminen im Jahr wurden einige gleichexponierte Zweige bzw. Jungpflanzen vor Sonnenaufgang gesammelt und ein Teil der Nadeln der ersten 3 Jahrgänge so rasch wie möglich frisch und nach 48stündiger Trocknung bei 105° im Thermostaten gewogen und der als Gewichtsdifferenz ermittelte Wassergehalt auf Gramm Trockengewicht umgerechnet. Der andere Teil der Nadeln wurde in Glasbehältern wasserdicht verschlossen, durch rasches Erhitzen im Wasserbad auf 100° abgetötet und ihr Zellsaft durch Auspressen gewonnen. Der osmotische Wert dieses Preßsaftes wurde auf kryoskopischem Wege an Hand der Gefrierpunktserniedrigung bestimmt und in at. umgerechnet (WALTER 1931).

Beide Größen besitzen Zeigerwert zur Beurteilung des Wasser-, in gewissen Grenzen aber auch des Gesamtzustandes der Pflanzen (WALTER 1931).

g) Die Messung des Chlorophyllgehaltes. Zu mehreren Terminen im Jahr wurde eine Anzahl von gleichexponierten Zweigen bzw. Jungpflanzen gesammelt, so rasch wie möglich von Obergurgl nach Innsbruck gebracht und dort bis zur Bestimmung am nächsten Tag im Eiskasten kühl und dunkel gehalten. Dann wurden die Nadeln der jüngsten 3 Jahrgänge gut durchmischt und 3 Proben zu 500 mg Frischgewicht herausgewogen. An einer vierten Parallelprobe bestimmte ich den Wassergehalt, um nachträglich den Chlorophyllgehalt auf das Trockengewicht umrechnen zu können. Die 3 Nadelproben wurden mit der Schere gut zerkleinert und mit reinem Quarzsand in 95%igem Aceton solange zerrieben, bis keine grün gefärbten Nadelstücke mehr sichtbar waren. Das Reibprodukt wurde mit einigen Kubikzentimeter Aceton übergossen und im Dunkeln zur Vollendung der Extraktion eine halbe Stunde stehen gelassen. Dann wurde die Probe in eine Glasfilternutsche übertragen, die grüne Farbstofflösung unter mehrmaligem Nachwaschen mit Aceton mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und auf 100 cm^3 aufgefüllt.

Die Absorption dieser Lösung bestimmten wir mit dem Universalkolorimeter der Fa. Lange im durch RG 2 gefilterten Licht nach der Ausschlagmethode (LANGE 1952). Da die spektrale Durchlässigkeit des RG 2-Filters das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b einschließt, das von Karotin und Xanthophyll hingegen ausschließt (SEYBOLD und WEISSWEILER 1943), konnte der Chlorophyllgehalt ohne Isolierung der grünen Farbstoffe unmittelbar aus dem Rohextrakt ermittelt werden (vgl. GASSNER und GOEZE 1934). Die Absorptionswerte wurden anschließend auf Grund einer einmal empirisch ermittelten Eichkurve einer Bezugslösung, die wir stufenweise verdünnten, in relative Chlorophyllgehalte umgerechnet und stets auf das Trockengewicht bezogen (vgl. ZELLER 1936).

III. Das Mikroklima von Jungzirben im Winter 1954/55

1. Die Nadeltemperatur über und unter Schnee

Die Nadeltemperatur der frei exponierten Jungzirben, die sich einige Zentimeter *über die Erd- bzw. Schneeoberfläche* erheben, wurde von Ende Oktober bis Ende November und während der Monate März, April und Mai gemessen. In diesem Zeitraum zeichnete sie ein Fallbügelschreiber lückenlos in Abständen von 2 Minuten auf.

Die Nadeltemperatur schwankte gleichsinnig mit der Lufttemperatur in einer englischen Hütte (Abb. 3), zeigte jedoch rund doppelt so große Tagesamplituden (Tabelle 2). Diese vergleichsweise stärkere Temperaturschwankung beruht darauf, daß die bodennahe Luftschicht, in der sich die Nadeln befinden, in der Nacht kühler und am Tag wärmer ist als die Luft in 2 m Höhe (MICHAELIS 1934a) und daß sich die Nadeln in der Nacht durch Ausstrahlung unter die Lufttemperatur abkühlen, am Tage jedoch durch Strahlungsabsorption über diese erwärmen (MICHAELIS 1934b, PISEK und SCHIESSL 1947). Im November wie in allen Monaten in denen der Ausstrahlungstypus den größeren Zeitraum des Tages einnimmt, war die nächtliche Unterkühlung der bodennahen Nadeln beträchtlich. Sie betrug für die Zirbe H_2 im November im Extrem 9,3°, im Mittel aller Tage noch 4,1° (Tabelle 2). Im gleichen Zeitraum waren die Nadeln maximal nur um 4,8° wärmer als die Hütten-

luft, so daß das Monatsmittel der Nadeltemperatur um 2,0° tiefer lag als das der Hüttentemperatur[1].

Im März verschob sich das Verhältnis zwischen Überwärmung und Unterkühlung; die Einstrahlung war intensiver als im November und dauerte länger an. Dementsprechend überwärmten sich die Nadeln nun maximal um 10,5°, während die größte Unterkühlung nur mehr 4,2° (im Mittel 1,1°) betrug. Im Monatsmittel glichen sich Unterkühlungen und Überwärmungen aus. Im April erwärmten sich die Nadeln oberhalb der strahlenreflektierenden Schneeoberfläche am stärksten, an einem Tag sogar um 21,5° C(!) und im Mittel aller Tage des Monats noch um 11,0° über die Lufttemperatur in der Hütte. Die nächtliche Unterkühlung nahm weiter ab (Maximum 3,8°, Mittel 0,8°). In diesem Monat erfuhren die Pflanzen oberhalb der Schneedecke den größten Temperaturwechsel zwischen Tag und Nacht (maximale Tagesamplitude 34,0°!). Im Mai nahmen infolge Ausapern (d. h. Verschwinden der Reflexion) Überwärmung und Amplituden wieder etwas ab und erreichten erst im Hochsommer im August ungefähr die gleichen Werte wie im März. Die Unterkühlungen waren im Mai auffallend hoch (vgl. Dimitz 1949). Sie blieben auch im August in einem Ausmaß feststellbar, das den Märzverhältnissen entsprach.

Die Erwärmung der Jungpflanzen in boden- und schneenaher Luftschicht am Tage war häufig so ausgiebig, daß ihre Nadeln auf sonnexponierten Standorten während des allerdings relativ milden Versuchswinters überraschend oft über 0° kamen (Tabelle 2). Im September und Oktober sowie im April und Mai wurde der Gefrierpunkt fast täglich überschritten, nur im Dezember und vor allem im Februar blieb die Temperatur auch tagsüber häufig unter 0°. An 226 von 373 Tagen der gesamten Versuchsperiode (das sind 83%) waren die Nadeln wenigstens zeitweise auf über 0° temperiert.

Die Nadeltemperaturen der auf dem West- und Nordhang stehenden Versuchszirben W_1 und N_2 wichen beträchtlich von den Werten der bisher beschriebenen Zirbe H_2 ab. Im November wurden die Messungen an allen dreien über den ganzen Monat fortlaufend durchgeführt, so daß man sie vergleichen kann (Tabelle 3). Erwartungsgemäß wurden die Nadeln am Westhang tagsüber am wärmsten, während sie am Nordhang am kühlsten blieben. Der Unterschied der mittleren Maxima betrug 8,1°, die Monatsmittel differierten noch um 0,9°. Das beruht darauf, daß der Nordhang in dieser Jahreszeit bereits den ganzen Tag über im Schatten lag, während die Sonne den Westhang gerade zur Zeit der größten Lufterwärmung unter einem Winkel von 60° bestrahlte.

[1] Die Überwärmungsmaxima hielten im Gegensatz zu den tiefsten Unterkühlungswerten oft nur sehr kurze Zeit an, wenn z. B. minutenlang weitgehende Luftruhe herrschte, beeinflussen daher das Tagesmittel weniger als letztere und haben geringere biologische Bedeutung.

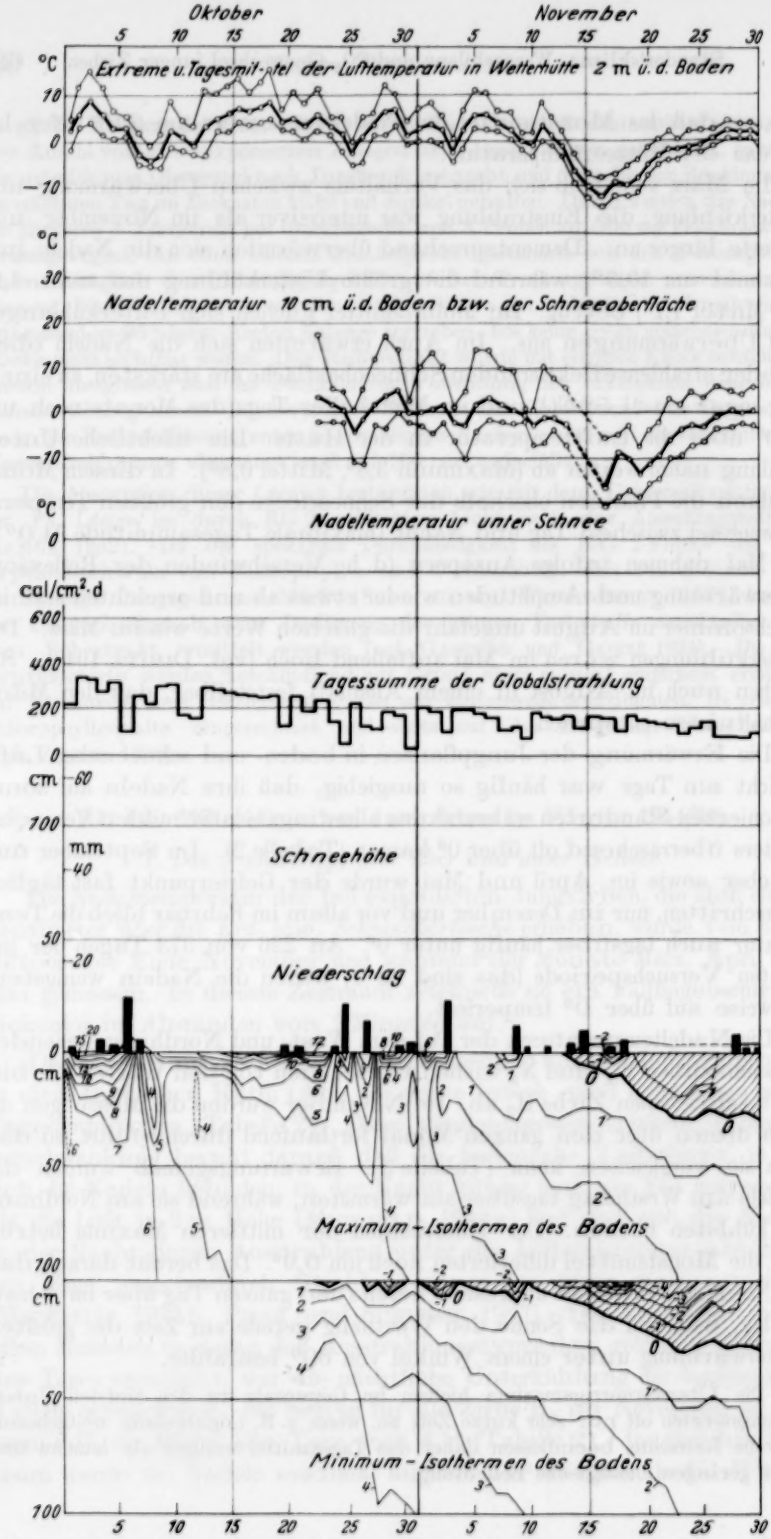
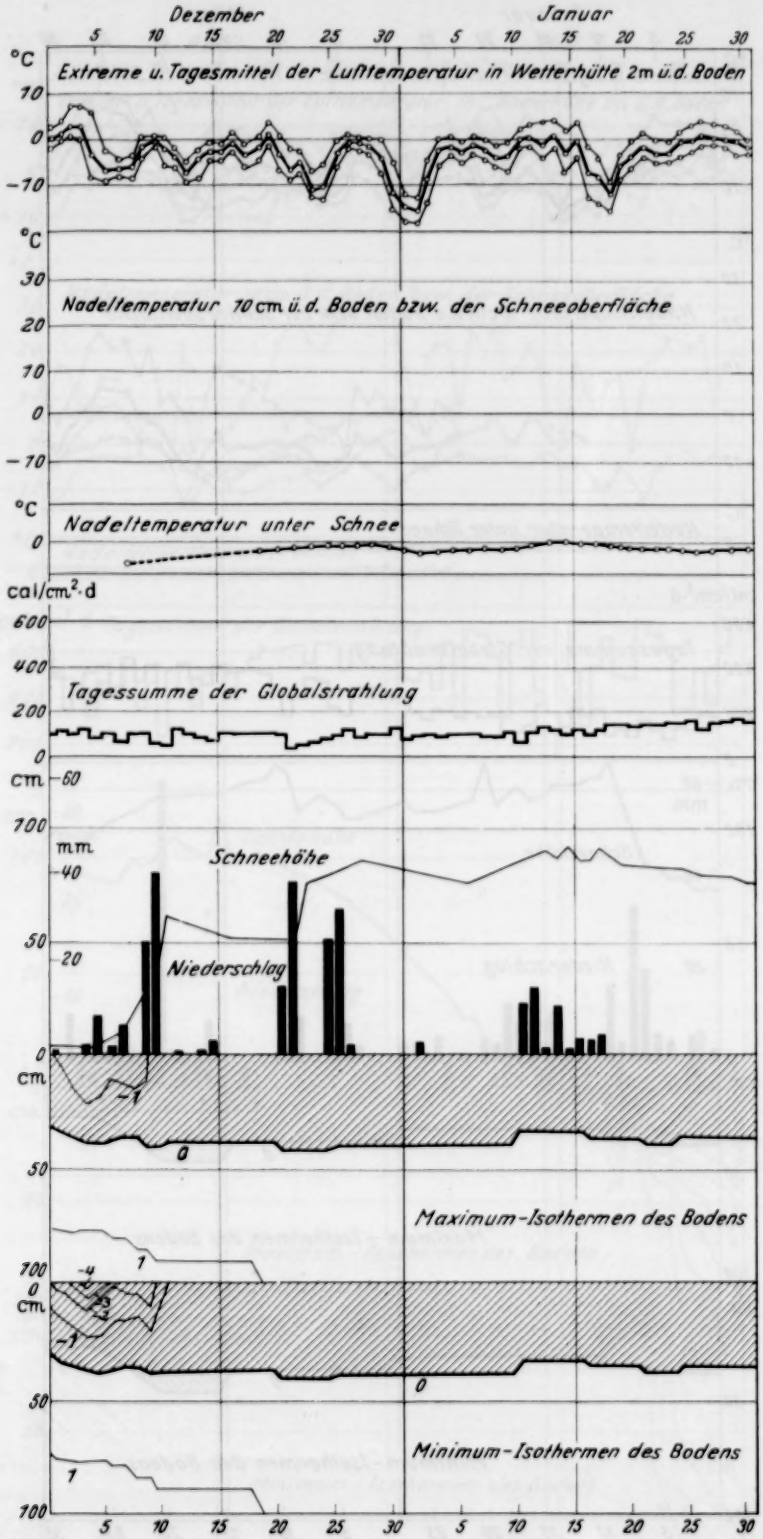
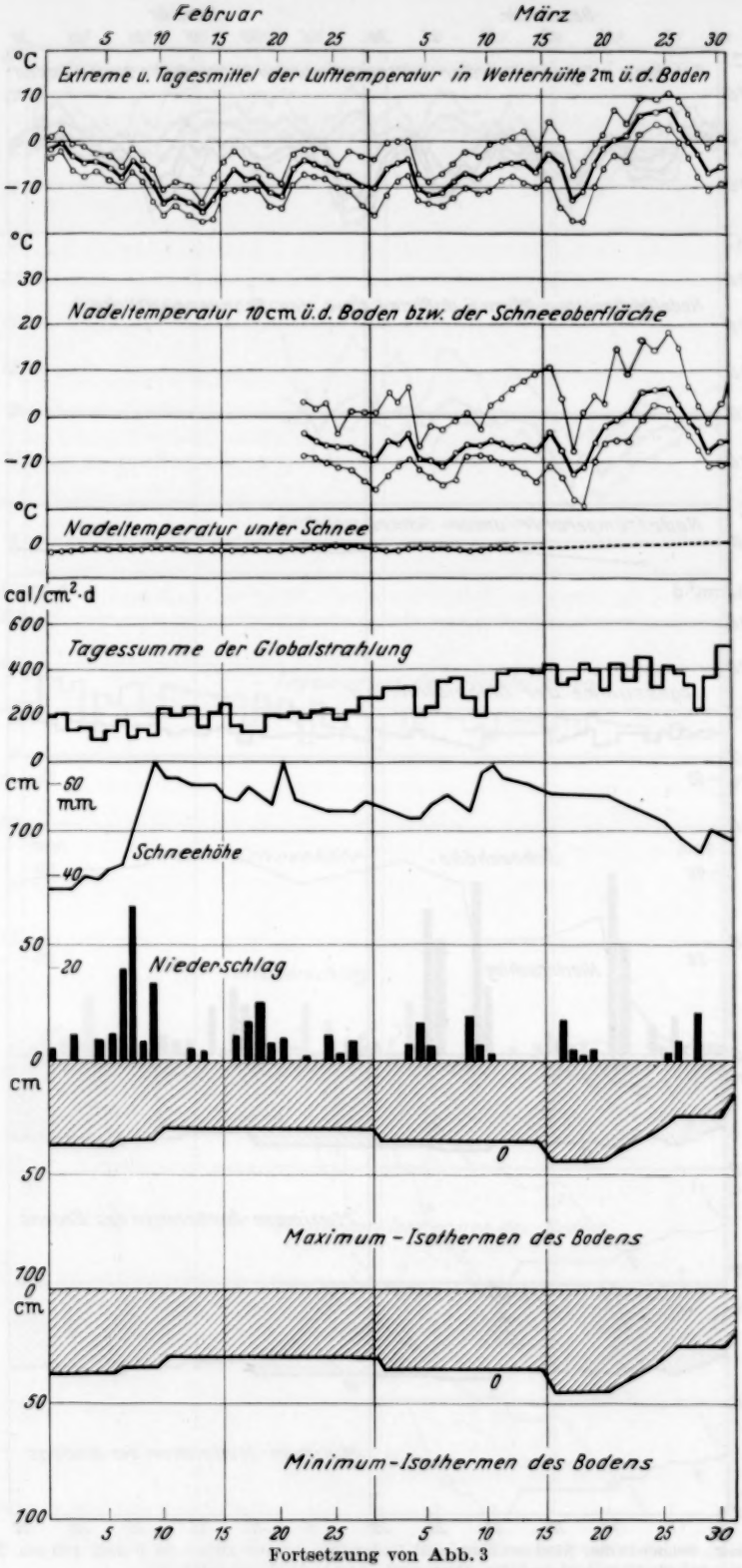


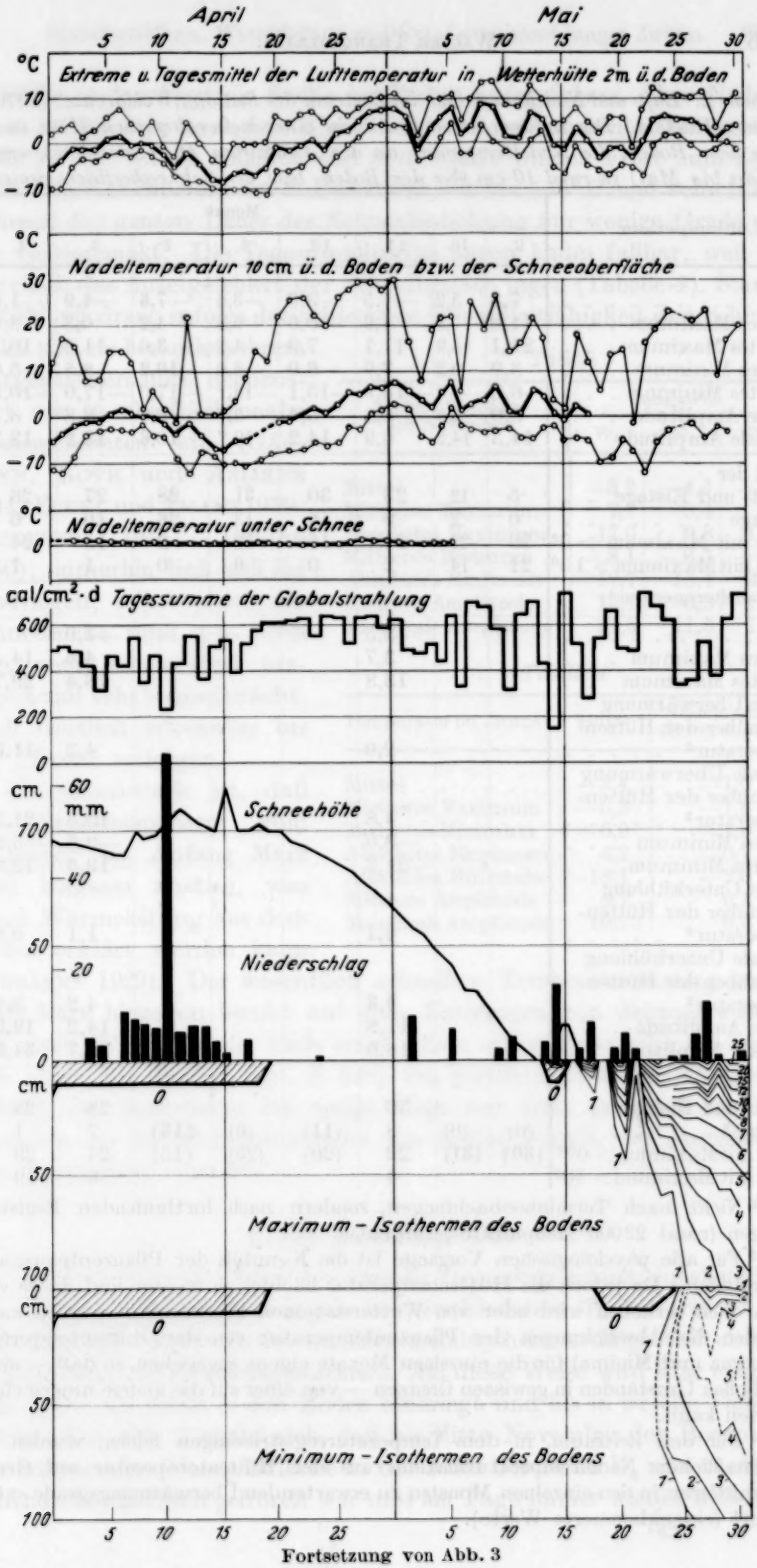
Abb. 3. Lufttemperatur (Wetterhütte), Nadeltemperatur über und unter Schnee, Global- im Winter 1954/55. Die Messungen wurden im Zentrum der Station



strahlung, Schneehöhe, Niederschlag und Bodentemperatur zwischen 0 und 100 cm Tiefe Waldgrenze auf einer horizontalen Hangstufe (Abb. 1) durchgeführt



Fortsetzung von Abb. 3



Fortsetzung von Abb. 3

Tabelle 2. *Luft- und Nadeltemperatur im Zentrum der Station „Waldgrenze" (2070 m) Winter 1954/55. Die Lufttemperatur wurde in einer meteorologischen Hütte in 2 m über dem Boden, die Nadeltemperatur an den Jungzirben H_2 (November) und H (März bis Mai) in rund 10 cm über der Boden- bzw. der Schneeoberfläche gemessen*

Lufttemperatur	Monat								
	9.	10.	11.	12.	1.	2.	3.	4.	5.
Mittel	**7,5**	3,2	—1,5	—3,6	—3,4	**—7,6**	—4,9	—1,6	3,0
Mittleres Maximum	**11,9**	7,8	1,9	—0,6	—0,3	—4,2	0,3	3,4	8,3
Absolutes Maximum	**21,1**	15,9	11,1	7,0	4,2	3,0	11,0	10,1	14,2
Mittleres Minimum	3,9	0,2	—3,9	—6,0	—6,0	**—10,2**	—8,5	—5,0	—1,3
Absolutes Minimum	—6,0	—6,0	—14,9	—15,1	**—18,1**	—17,0	—17,0	—10,8	—7,2
Mittlere Amplitude	8,0	7,6	5,8	5,4	5,7	6,0	8,8	8,4	**9,6**
Maximale Amplitude	14,3	14,2	8,9	14,2	10,7	10,6	**15,2**	13,3	15,1
Anzahl der Frost- und Eistage	5	12	23	30	**31**	**28**	27	26	21
Eistage	0	2	9	16	13	**26**	16	6	1
Tage mit Maximum $> 0^0$	**30**	29	21	15	18	2	15	24	30
Tage mit Maximum $> 10^0$	**21**	14	2	0	0	0	1	1	14
Nadeltemperatur[1]									
Mittel			—3,5				—4,9		
Mittleres Maximum			3,7				4,6	14,4	16,1
Absolutes Maximum			13,8				18,4	29,7	30,1
Mittlere Überwärmung gegenüber der Hüttentemperatur[2]			2,0				4,3	**11,0**	7,8
Maximale Überwärmung gegenüber der Hüttentemperatur[2]			4,8				10,5	**21,5**	18,7
Mittleres Minimum			—8,0				—9,6	—5,8	—3,5
Absolutes Minimum			—21,2				—19,5	—12,0	—12,0
Mittlere Unterkühlung gegenüber der Hüttentemperatur[2]			**4,1**				1,1	0,8	2,2
Maximale Unterkühlung gegenüber der Hüttentemperatur[2]			**9,3**				4,2	3,8	7,4
Mittlere Amplitude			11,8				14,2	**19,9**	19,5
Maximale Amplitude			18,0				22,7	**34,0**	29,7
Anzahl der Frost- und Eistage			30				28	28	28
Eistage[3]	(0)	(0)	8	(11)	(6)	**(13)**	7	1	1
Tage mit Maximum $> 0^0$[3]	**(30)**	**(31)**	22	(20)	(25)	(15)	24	29	30
Tage mit Maximum $> 10^0$			4				6	19	24

[1] Nicht nach Terminbeobachtungen, sondern nach fortlaufenden Registrierungen (rund 22000 Meßpunkte je Monat).

[2] Für alle physiologischen Vorgänge ist die Kenntnis der Pflanzentemperatur unerläßlich. Da jedoch die Hüttentemperatur leichter zu messen und daher vielfach allein erhoben wird oder von Wetterstationen übernommen werden kann, wurden die Abweichungen der Pflanzentemperatur von der Hüttentemperatur (Maxima und Minima) für die einzelnen Monate eigens angegeben, so daß — unter ähnlichen Umständen in gewissen Grenzen — von einer auf die andere umgerechnet werden kann.

[3] Für den Zeitraum, in dem Temperaturregistrierungen fehlen, wurden die mutmaßlichen Nadeltemperaturmaxima aus der Hüttentemperatur auf Grund der mittleren in den einzelnen Monaten zu erwartenden Überwärmungsgrade extrapoliert (eingeklammerte Werte).

Völlig anders liegt die Sache bei Zirben *unter Schnee*. Ihre Nadeln haben bereits kurz nach dem Einschneien nahezu konstante Temperatur (Abb. 3). Sie betrug entsprechend dem relativ milden Frost zum Zeitpunkt des Einschneiens am 8. Dezember —4 bis —5° C und schwankte während der ganzen Dauer der Schneebedeckung nur wenige Grade um den Gefrierpunkt. Die Tagesamplituden waren kaum faßbar, weil sie innerhalb des Anzeigefehlers der Schreibgeräte lagen (Tabelle 4). Starke Abkühlung drang infolge der schlechten Wärmeleitfähigkeit der Schneedecke (die sie besonders ihrem Luftgehalt verdankt) nennenswert nur in oberflächennahe Schneeschichten ein (Gäumann, Roth und Anliker 1934; Eckel und Thams 1939; Sauberer 1947; Geiger 1950); immerhin ließ sich ihr Eindringen, selbst wenn die Schneedecke rund 1 m hoch war, wenn schon stark verzögert und sehr abgeschwächt, doch deutlich erkennbar bis zur Pflanze verfolgen.

Tabelle 3

Nadeltemperatur im November	Jungzirbe		
	W_1	N_2	H_2
Mittel	—3,2	—4,1	—3,5
Mittleres Maximum	7,7	—0,4	3,7
Absolutes Maximum	17,0	9,8	13,8
Mittleres Minimum .	—8,1	—6,7	—8,0
Absolutes Minimum	—19,7	—15,4	—21,2
Mittlere Amplitude .	15,7	6,3	11,8
Maximale Amplitude	22,5	11,5	18,0

Tabelle 4

Temperatur im Januar	Hütte	Nadeln unter 60 cm Schnee
Mittel	—3,4	—1,9
Mittleres Maximum	—0,3	—1,8
Mittleres Minimum	—6,0	—1,9
Absolutes Maximum	4,2	—0,7
Absolutes Minimum	—18,1	—3,0
Mittlere Amplitude	5,7	0,1
Maximale Amplitude	10,7	0,4

Charakteristisch ist, daß die Nadeltemperatur vom Dezember bis Anfang März ganz langsam anstieg, was durch Wärmeleitung aus dem Boden erklärt werden kann (Keränen 1929). Der wesentlich schnellere Temperaturanstieg gegen Ende März hingegen beruht auf dem Eindringen von Schmelzwasser, das rasch Wärme in die Tiefe trägt. Zum selben Zeitpunkt erwärmte sich auch der Boden (vgl. S. 628) aus gleicher Ursache (Michaelis 1934b). Im Spätwinter bis einige Tage vor dem Ausapern im Mai herrschte an der Bodenoberfläche wie in den Nadeln der Jungzirben eine Temperatur von 0° C.

2. Die Bodentemperatur

Die Ergebnisse der über den ganzen Versuchszeitraum durchgeführten Bodentemperaturmessungen in verschiedenen Tiefen wurden in Abb. 3 in Form von Maximum- und Minimumisothermen dargestellt und die 0°-Isotherme stark herausgezeichnet. Auf diese Weise wird klar ersichtlich, wann der Frost in den Boden eindringt und bis in welche Tiefe er reicht. Aus Abb. 3 ergibt sich, daß bis Mitte November der Boden auf der horizontalen Versuchsfläche in der Nähe der Zirbe H_2 nur vorübergehend oberflächlich gefroren war und am Tage immer wieder auftaute.

Infolge des Kälteeinbruches Mitte November drang der Frost erstmalig in größere Tiefe und wich nun in der Rhizosphäre der Jungpflanzen, die bis in etwa 15 cm Tiefe reicht, auch tagsüber nicht. Es ist daher damit zu rechnen, daß der Wassernachschub von diesem Zeitpunkt an unterbrochen war. Trotzdem sich die Luft Ende November wieder erwärmte, blieb der Boden infolge der thermischen Isolation durch die 5 cm hohe Schneedecke bis in 30 cm Tiefe gefroren. Nach dem Aufbau einer geschlossenen und mächtigeren Schneedecke wurde der Boden ähnlich wie die Nadeln nahezu temperaturkonstant. Die 0°-Isotherme verlief in 40 cm Tiefe; darüber (also in der Rhizosphäre) herrschte eine Temperatur von 0 bis —1° C. Dieser Zustand hielt bis Ende März an, als durch die nun einsetzende Schneeablation Wärme mit dem Schmelzwasser rasch in die Tiefe drang und den Boden ähnlich wie die Nadeln erwärmte. Die 0°-Isotherme stieg und erreichte am 20. 4. die Oberfläche. Um diese Zeit taute der Boden in der Rhizosphäre auf und den Wurzeln stand wieder Wasser zur Verfügung. Nach dem Ausapern der Meßstelle am 13. Mai erwärmte sich die Bodenoberfläche sehr rasch und die Wärme drang wieder in die Tiefe.

Der Bodenfrost, der Mitte November die Pflanzenwurzeln erreicht haben dürfte, konnte sich also dort 5 Monate hindurch halten. Pflanzen, deren Nadeln über die Schneeoberfläche ragten, müssen sich daher in der langen Zeit, wo jede Wassernachleitung aus dem Boden unterbunden ist durch hydroaktiven Spaltenschluß (STÅLFELT 1929) vor dem Vertrocknen schützen (vgl. MICHAELIS 1934c, SCHMIDT 1936), da sonst ihre Wasserreserven zu stark beansprucht werden (vgl. S. 632). Dadurch wird zwangsläufig über lange Zeiten die CO_2-Aufnahme von außen, also auch die Netto-Assimilation stillgelegt, weil nur auf stomatärem Wege nennenswerter C-Reingewinn möglich ist (STÅLFELT 1935, PISEK und WINKLER 1956).

3. Die Strahlung

Um einen Überblick über die Strahlungsverhältnisse im Versuchswinter 1954/55 zu bekommen, wurden in Abb. 3 auch die Tagessummen der Einstrahlung auf das horizontal exponierte Sternpyranometer am freiesten Punkt der Station (Basis) dargestellt. Die Strahlungssummen der einzelnen Tage unterscheiden sich stark auf Grund der wechselnden Bewölkungsverhältnisse (der hellste und der dunkelste Tag eines Monats verhielt sich im Extrem wie 1:10) und auf Grund der Sonnenstände. Die Monatssumme der Einstrahlung (Tabelle 5) sank vom September bis zum Dezember, erreichte in diesem Monat ein Minimum und stieg hernach etwa symmetrisch wieder an, so daß Januar und November, Februar und Oktober, März und September etwa gleiche Strahlungssummen aufwiesen. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß freistehende

Tabelle 5. *Global-(Sonnen- und Himmels-)Strahlung im Zentrum der Station in der Nähe der Jungzirbe H_2 etwa 1 m über der Erd- bzw. Schneeoberfläche in cal/cm²*

Strahlung	Monat								
	9.	10.	11.	12.	1.	2.	3.	4.	5.
Monatssumme	9162	6820	4008	2834	3829	5208	10894	15349	16499
Mittlere Tagessumme .	305	220	134	91	124	186	351	512	532
Maximale Tagessumme	516	340	199	124	164	279	507	640	738
Minimale Tagessumme	64	36	66	38	73	101	207	235	153
Mittleres Maximum (cal/cm² · min) . . .	1,23	0,90	0,65	0,48	0,61	0,79	1,22	1,51	1,68
Anzahl der Tage[1] . .	28	25	16	0	14	25	31	30	31

[1] an denen das Strahlungsoptimum der Assimilationstagessumme (130 cal) überschritten wird.

Pflanzen zum Zeitpunkt des Ausaperns im Mai rund 3mal so stark bestrahlt wurden als kurz vor dem Einschneien im Dezember. Die Monatssummen vom Dezember und Mai verhielten sich sogar wie 1:6.

Die Strahlung reichte in den hellen Stunden *aller* Tage des Winters aus, um bei den *freiexponierten* Zirben Netto-Assimilation zu ermöglichen. Der dunkelste Tag der Versuchsperiode (22. 12. 1954) brachte immer noch ein Strahlungsmaximum von 7,2 cal/cm² · h, was rund 9000 Lux entspricht; ein Betrag, der außerhalb des Winters für den Halbwert maximaler Assimilation (für Sonnenzirben etwa 7000 Lux, Tranquillini 1955) ausreichte. Volle Assimilation und optimale Tagesleistung (Tagesstrahlungssumme >130 cal, vgl. Abb. 7) wäre im Versuchszeitraum allerdings erst ab März *stets* möglich gewesen. In den anderen Monaten begrenzte das Licht an mehr oder weniger Tagen die Assimilationsleistung, vor allem im Dezember, wo das Lichtoptimum der Assimilation auch am hellsten Tage nicht erreicht wurde (Tabelle 5).

Völlig anders ist das Strahlungsklima der Pflanzen *unter der Schneedecke*. Die auf die Schneeoberfläche auffallende Strahlung wird z. T. reflektiert, der eindringende Teil in der Schneedecke zerstreut und absorbiert. Die Schwächung der eindringenden Strahlung ist so groß, daß schon unter einer nur wenige Dezimeter hohen Schneedecke die Anzeigegeräte, auch wenn sie auf höchste Empfindlichkeit gestellt waren (1 Skt. = 0,46 cal/cm² · h), keinen meßbaren Ausschlag mehr zeigten. Um trotzdem einen Anhaltspunkt für die Lichtdurchlässigkeit der horizontalen, ungestörten Schneedecke in der Nähe der Versuchszirbe H_2 vor ihrem Ausapern zu bekommen, wurde eine Photozelle am 29. 4. 1955 um 14 Uhr im feuchten Firnschnee vergraben und die ursprünglich 60 cm hohe Schneedecke in weitem Umkreis in planparallelen Schichten schrittweise abgehoben. Die Stärke des vollen Tageslichts betrug rund 70000 Lux. Aus Abb. 4 kann entnommen werden, wieviel Prozent davon durch den Schnee in verschiedene Tiefen eindrangen. Schon in

2 cm Tiefe kam nur mehr die Hälfte des vollen Tageslichtes an, in 8 cm rund $^1/_4$, in 18 cm Tiefe $^1/_{10}$, also nur mehr 7000 Lux. In 60 cm Tiefe wurden nur mehr 100 Lux festgestellt. Da Sonnenzirben die Atmung bei etwa 500 Lux kompensieren, bei 7000 Lux die halbe und bei 25000 Lux die volle Netto-Assimilationsintensität erreichen (TRANQUILLINI 1955), könnten Jungzirben, soweit es aufs Licht ankommt, im April an strahlungsreichen Tagen bereits unter einer Schneedecke von rund 50 cm Höhe kompensieren, in 15 cm Tiefe mit halber und in 2 cm Tiefe mit voller Intensität assimilieren.

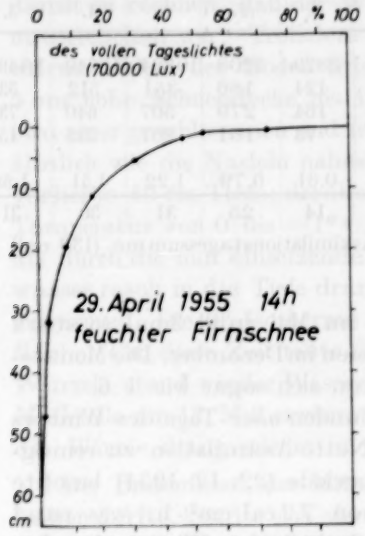


Abb. 4. Verlauf der relativen Strahlungsintensität in der Schneedecke bis in 60 cm Tiefe. Frisch gefallener, trockener Pulverschnee läßt weniger Licht durch

Im trockenen, frischgefallenen Pulverschnee ist allerdings die Lichtdurchlässigkeit infolge stärkerer Zerstreuung (großer Gehalt an feinverteilter Luft) weit geringer (SAUBERER 1947), was aber für unsere Jungpflanzen geringe Bedeutung hat, da ihre photosynthetische Aktivität im Hochwinter vermindert ist (vgl. Abschnitt VII, 3).

IV. Die Wasserbilanz der Zirbe im Winter 1955/56

Um einen Einblick in die Wasserbilanz während des Winters zu erhalten, wurde zu mehreren Terminen vor Sonnenaufgang Wassergehalt und osmotischer Wert von repräsentativen Jung- und Altzirben der Wald- und Baumgrenze bestimmt. Die Meßwerte, sowie die daraus berechneten Produkte O × W sind in Abb. 5 zusammengestellt.

Der *Wassergehalt* südexponierter Nadeln des zur Untersuchung herangezogenen a) erwachsenen Zirbenbaumes war auffallend konstant. Die Nadeln verloren im Verlauf des Winters nur 13% des Wassers, das sie Anfang November hatten. Im Vergleich dazu schwankte b) der Wassergehalt von Jungzirbennadeln oberhalb der Schneedecke bedeutend stärker; im Herbst waren sie am wasserreichsten, verloren dann vom Oktober bis Februar an der Waldgrenze 36%, an der klimatisch extremeren Baumgrenze sogar 52%, also etwas mehr als die Hälfte des herbstlichen Wasservorrates. Im April und Mai wurde die Wasserbilanz der Jungzirben wieder besser, weil in dieser Zeit der Boden auftaute und die Wurzeln wieder Wasser aus diesem aufnehmen konnten. Die geringsten Wasserverluste erlitten die Nadeln unter der Schneedecke; ja sie wurden vom Januar ab bis zum Ausapern sogar laufend wasserreicher.

Die Wasserzunahme der schneebedeckten Nadeln dürfte zunächst darauf beruhen, daß Schneekristalle Feuchte zugunsten der Blätter abgeben (Sauberer 1947); später — wenigstens ab April — wird Wasser

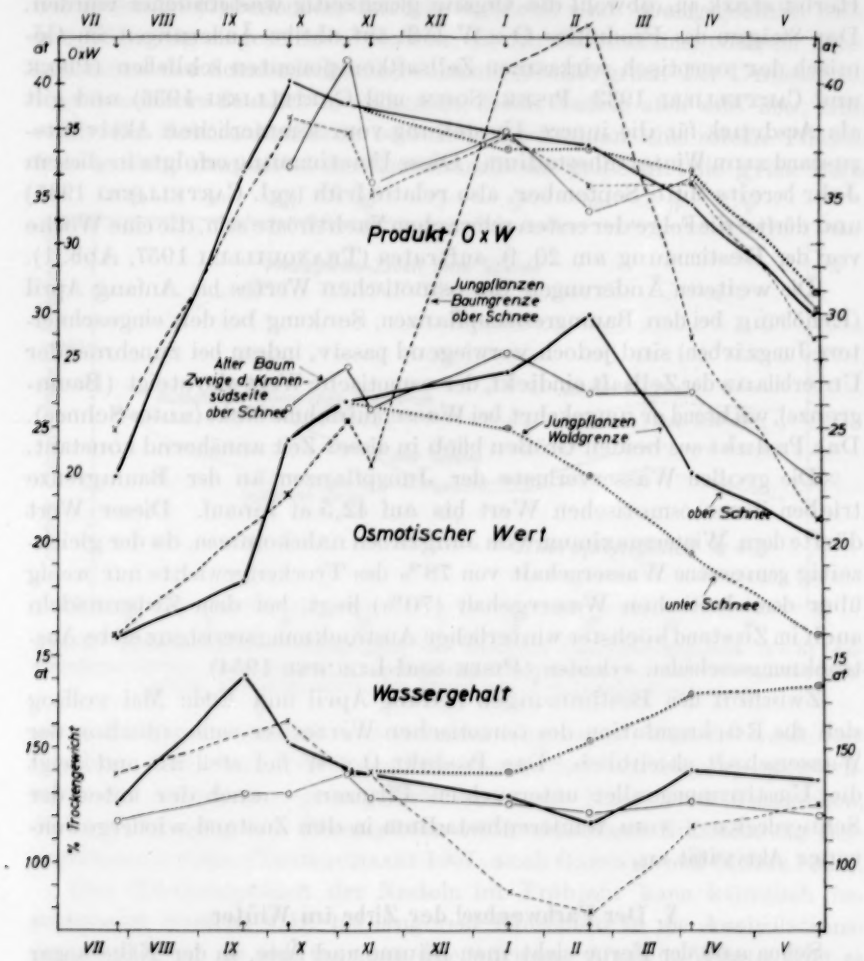


Abb. 5. Jahreszeitliche Veränderungen von Wassergehalt, osmotischem Wert und dem Produkt aus beiden ($O \times W$) verschiedener Zirben. Die Bestimmung erfolgte stets vor Sonnenaufgang. Die 3 letzten Nadeljahrgänge wurden jeweils zu einer Probe zusammengefaßt

aus dem Boden aufgenommen, während gleichzeitig die Transpiration wegen Wassersättigung der Porenluft im Schnee unmöglich ist. Die bessere Wasserbilanz von Altbäumen im Vergleich zu den Jungpflanzen hat ihren Grund sicherlich darin, daß erstere viel tiefer wurzeln und ihre Wasseraufnahme durch den Bodenfrost, der unter Schnee nur einige Dezimeter tief reicht (Abb. 3) selbst im Hochwinter kaum behindert

ist; auch haben sie größere Wasserreserven im Stamm und Ästen zur Verfügung, solange diese nicht gefroren sind.

Der *osmotische Wert* der Jungzirbennadeln stieg vom Sommer zum Herbst stark an, obwohl die Organe gleichzeitig wasserreicher wurden. Das Steigen des Produktes O × W läßt auf aktive Änderungen im Gemisch der osmotisch wirksamen Zellsaftkomponenten schließen (PISEK und CARTELLIERI 1933; PISEK, SOHM und CARTELLIERI 1935) und gilt als Ausdruck für die innere Umstellung vom sommerlichen Aktivitätszustand zum Winterruhestadium. Diese Umstimmung erfolgte in diesem Jahr bereits Mitte September, also relativ früh (vgl. CARTELLIERI 1935) und dürfte die Folge der ersten schwachen Nachtfröste sein, die eine Woche vor der Bestimmung am 20. 9. auftraten (TRANQUILLINI 1957, Abb. 1).

Die weiteren Änderungen des osmotischen Wertes bis Anfang April (Erhöhung bei den Baumgrenzenpflanzen, Senkung bei den eingeschneiten Jungzirben) sind jedoch vorwiegend passiv, indem bei zunehmender Unterbilanz der Zellsaft eindickt, der osmotische Wert also steigt (Baumgrenze), während er umgekehrt bei Wasseraufnahme sinkt (unter Schnee). Das Produkt aus beiden Größen blieb in dieser Zeit annähernd konstant.

Die großen Wasserverluste der Jungpflanzen an der Baumgrenze trieben ihren osmotischen Wert bis auf 42,5 at hinauf. Dieser Wert dürfte dem Wintermaximum von Jungzirben nahekommen, da der gleichzeitig gemessene Wassergehalt von 78% des Trockengewichts nur wenig über dem kritischen Wassergehalt (70%) liegt, bei dem Zirbennadeln auch im Zustand höchster winterlicher Austrocknungsresistenz erste Austrocknungsschäden erleiden (PISEK und LARCHER 1954).

Zwischen den Bestimmungen Anfang April und Ende Mai vollzog sich die Rückregulation des osmotischen Wertes; er sank, obschon der Wassergehalt gleichblieb. Das Produkt O × W fiel steil ab und zeigt die Umstimmung aller untersuchten Pflanzen — auch der unter der Schneedecke — vom Winterruhestadium in den Zustand wiedergewonnener Aktivität an.

V. Der Farbwechsel der Zirbe im Winter

Schon aus der Ferne sieht man Bäume und Äste, in der Nähe sogar die einzelne Nadel im Winter sonnseitig mehr oder weniger gelbgrau verfärbt (bezüglich Fichte vgl. SCHMIDT 1936). Die Umfärbung setzt im Spätherbst ein, erreicht im Spätwinter ihren Höhepunkt und bildet sich im Frühjahr wieder zurück.

Zahlreiche Beobachtungen an verschiedenen Zirben im Stationsbereich ergaben, daß die Verfärbung in Tallagen weniger auffallend ausgeprägt ist als in Hochlagen. Starke Farbunterschiede bestehen zwischen den Nadeln der besonnten Südseite und der beschatteten Nordseite bzw. aus dem Inneren jeder Baumkrone. Die stärkere Ausbleichung der südseitig exponierten Nadeln ist in jedem Nadelbüschel, ja sogar an jeder

Einzelnadel festzustellen, deren Südflanke gelblicher erscheint als die Nordflanke. Am weitesten geht sie bei Nadeln unmittelbar über der Schneeoberfläche, die infolge der hohen Albedo der Schneedecke (>88% SAUBERER 1947) besonders intensiv bestrahlt sind. Demgegenüber bleiben frühzeitig eingeschneite Nadeln, die im Dämmerlicht oder im Dunkeln unter der Schneedecke überwintern, lebhaft grün. Der Unterschied wird besonders deutlich an Pflanzen, deren Nadeln sich teils über, teils unter der Schneeoberfläche befinden. Stellt man eine solche Pflanze frei, so sieht man selbst an Einzelnadeln die gelbe und die grüne Zone

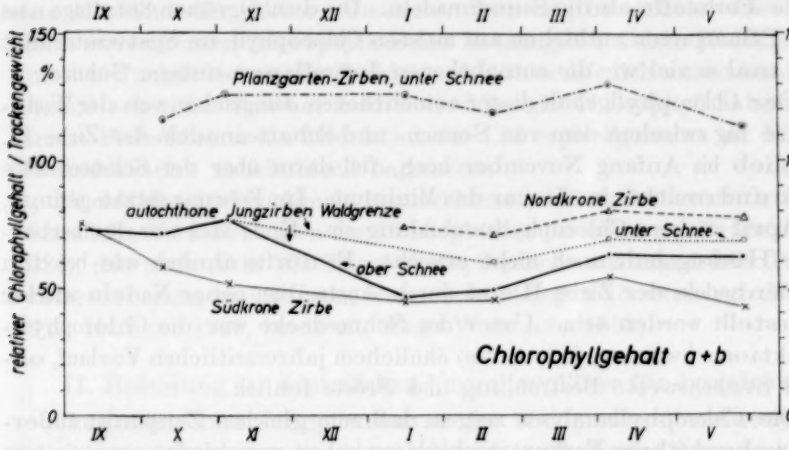


Abb. 6. Jahreszeitliche Veränderungen des relativen Chlorophyllgehaltes (a + b) verschiedener Zirben. Die 3 letzten Nadeljahrgänge wurden jeweils zu einer Probe zusammengefaßt, die Meßpunkte sind Mittel aus 3 Parallelbestimmungen

mit scharfem Trennstrich von einander abgesetzt. Weiters wurde beobachtet, daß schwachwüchsige Pflanzen stärker verfärben als gutwüchsige. Am intensivsten grün gefärbt waren die Nadeln von Jungzirben, die in tiefer gelegenen Pflanzgärten unter einseitiger N-Ernährung herangezogen wurden (TRANQUILLINI 1957; auch GASSNER und GOEZE 1943).

Das Wiederergrünen der Nadeln im Frühjahr kann künstlich beschleunigt werden, z. B. bei längerem Einschluß in die Assimilationsrezipienten, wo sie sich tagsüber überwärmen. Auch im Winter tritt es ein, wenn die Zweige im Zimmer warm gehalten werden und keine Nachtfröste mehr auf sie einwirken. Im Freien unterbleibt das Ergrünen im Hochwinter, obschon die Nadeltemperatur fast täglich den Gefrierpunkt überschreitet (Tabelle 2), da die niederen Temperaturen vor allem der Nächte die Chlorophyllneubildung verhindern (STÅLFELT 1927).

Um ein Maß für den Farbwechsel zu bekommen und seine Bedeutung für die Assimilation abschätzen zu können, wurde der Chlorophyllgehalt (a + b) von Nadeln des 1. bis 3. Jahrgangs verschiedener Zirben zu mehreren Terminen im Winter 1955/56 bestimmt. Die Meßwerte (Mittel aus je 3 Bestimmungen) sind in Abb. 6 zusammengestellt.

Südexponierte Nadeln der Zirbe H (Repräsentant starker Verfärbung) verloren bereits im Oktober Chlorophyll. Der Gehalt erreichte im Januar und Februar einen ersten Tiefstand, Ende Mai das Minimum. Zu diesem Zeitpunkt befand sich in den Sonnennadeln dieser allerdings schwachwüchsigen Zirbe nur halb soviel Chlorophyll wie im September. Der Chlorophyllabbau ging hier soweit, daß die Südseite der Krone erst durch Austreiben neuer Nadeln wieder ergrünte. Die Nadeln der Nordseite bzw. des beschatteten Kroneninnern vom gleichen Baum waren zu jedem Zeitpunkt chlorophyllreicher; sie enthielten gut $1^1/_2$mal so viel grüne Farbstoffe als die Sonnennadeln. Die dunkelgrünen Setzlinge aus dem Pflanzgarten enthielten am meisten Chlorophyll, im Spätwinter fast zwei mal so viel wie die autochthonen Jungpflanzen unterm Schnee.

Der Chlorophyllgehalt dieser autochthonen Jungzirben von der Waldgrenze lag zwischen dem von Sonnen- und Schattennadeln der Zirbe H. Er blieb bis Anfang November hoch, fiel dann über der Schneedecke stark und erreichte im Januar das Minimum. Im Februar setzte geringe, im April stärkere Chlorophyllneubildung ein. Ende Mai war der herbstliche Höchstgehalt noch nicht erreicht. Er dürfte ähnlich wie bei den Sonnennadeln der Zirbe H erst durch Austreiben neuer Nadeln wieder hergestellt worden sein. Unter der Schneedecke war die Chlorophyllreduktion schwächer, jedoch von ähnlichem jahreszeitlichen Verlauf, obwohl nennenswerte Bestrahlung und Fröste fehlten.

Die Chlorophyllanalysen zeigen, daß zum gleichen Zeitpunkt äußerlich wahrnehmbare Farbunterschiede zwischen verschieden exponierten Nadeln, sowie nacheinander im Laufe des Winters feststellbare Unterschiede gleichexponierter Nadeln parallel gehen mit Differenzen im Chlorophyllgehalt und daher zum Schluß berechtigen, daß letzterer an der Verfärbung maßgeblich beteiligt ist, was nach den Untersuchungen von STÅLFELT (1927) zu bezweifeln war.

Als äußere Ursache für die Depression des Chlorophyllgehaltes im Winter kommt in erster Linie die Strahlung in Betracht (Vergleich Süd- und Nordkrone, stärkste Verfärbung unmittelbar über der Schneeoberfläche). Durch die Untersuchungen von MONTFORT (1950) wissen wir, daß selbst bei Sonnenblättern alpiner Pflanzen im Sommer nach maximaler Bestrahlung Farbstoffmoleküle photochemisch zerstört werden können. Vermutlich werden im Winter die Zirben unter dem Einfluß tiefer Temperatur oder durch Austrocknung lichtempfindlicher, photolabiler. Dies wird um so wahrscheinlicher, als HENRICI (1927) an Steppengräsern im Betschuanaland nachwies, daß auch bei Wassermangel unter der Einwirkung intensiver Sonne das Chlorophyll weitgehend zerstört, bei Wiederherstellung guter Wasserversorgung aber regeneriert werden kann.

Zum kleinen Teil mag die hochwinterliche Chlorophyllabnahme vielleicht endogen sein, weil sie auch bei schwach (Innenkrone) und vor

allem bei fast gar nicht bestrahlten Nadeln (unter der Schneedecke) auftritt, allerdings stark gedämpft. Eine Parallele zur jahreszeitlichen Frosthärteschwankung aperer und eingeschneiter Zirben (TRANQUILLINI 1957) ist unverkennbar.

Es fragt sich, ob die Chlorophyllgehaltsschwankungen der Zirbennadeln deren Assimilation beeinflussen. Nach MICHAEL (1954) scheinen wenigstens Laubhölzer und Chamaecyparis im Sommer Chlorophyll in bedeutendem Überschuß zu haben. Erst bei einer Abnahme des Chlorophylls um mehr als 55% im Vergleich zu einer grünen Normalform war eine Abnahme der photosynthetischen Leistung bemerkbar. Der Vergleich zwischen den chlorophyllreichen Setzlingen aus dem Pflanzgarten und den Jungzirben an der Waldgrenze läßt es möglich erscheinen, daß letztere schon im Sommer kein überschüssiges Chlorophyll haben. In diesem Falle könnte die Reduktion des Chlorophyllgehaltes im Winter die Assimilation entscheidend begrenzen.

Abschließend sei nochmals daran erinnert, daß auch über strukturelle winterliche Veränderungen der Chloroplasten berichtet wurde (SCHMIDT 1936), die noch mehr als Chlorophyllspiegelschwankungen den Photosynthesevorgang beeinflussen, wenn nicht stillegen könnten (vgl. NOACK 1927, HUBERT 1935, beide zit. FREY-WYSSLING 1953).

VI. Bedeutung der winterlichen Umweltseinflüsse für Jungzirben

Jungbäume und Jungpflanzen an der Waldgrenze überwintern auf verschiedene Art; entweder sie entbehren fast ständig des Schneeschutzes (freistehende Exemplare auf windexponierten Standorten wie Rippen und Grate) oder sie befinden sich vom Zeitpunkt des Einschneiens bis zum Ausapern unter geschlossener Schneedecke (Pflanzen im Jungwuchsbestand, besonders in Rinnen und Mulden). Zwischen diesen Extremfällen gibt es alle Übergänge.

Je nach Überwinterungsart stehen die Bäumchen unter völlig verschiedenen klimatischen Verhältnissen und befinden sich daher in ungleichem physiologischen Zustand.

1. Pflanzen bzw. Pflanzenteile welche die Schneedecke überragen

Sie sind stets allen Schwankungen der Lufttemperatur ausgesetzt, kühlen sich darüber hinaus vor allem in der ersten Winterhälfte nachts beträchtlich unter diese ab (maximal um 9,3° gegenüber Hütte), während sie sich in der zweiten Winterhälfte am Tage viel stärker als die Luft erwärmen (im April maximal um 21,5°). Licht und Strahlung können ungeschwächt auf sie einwirken, besonders intensiv unmittelbar über der stark reflektierenden Schneeoberfläche. Die gelegentlich starke Überwärmung der Nadeln infolge der Bestrahlung, der Wind und die geringe Feuchtigkeit der Luft verursachen Wasserverluste, die, trotzdem die

Spaltöffnungen geschlossen sind, aus dem vom November bis März gefrorenen Boden nicht ausgeglichen werden können. An exponiertesten Standorten im Bereich der Kampfzone kann dabei im Februar der kritische Wassergehalt erreicht werden ($\approx 78\%$, $O^{wi}_{max} \approx 42$ at). Strahlung, Frost und Austrocknung führen zu Reduktion des Chlorophyllspiegels besonders bei südexponierten Nadeln, wo er bis auf die Hälfte des herbstlichen Höchstwertes sinken kann. Die gleichen Faktoren verursachen scheinbar auch eine Destruktion der Chloroplasten (SCHMIDT 1936).

Wenn auch soweit es auf das Licht ankommt und auf die Temperatur, die überraschend oft den Gefrierpunkt überschreitet, sowie mit Rücksicht auf den CO_2-Gehalt der Luft, der jahreszeitlich kaum schwankt (HUBER 1954) bei Pflanzen oberhalb der Schneedecke an den meisten Tagen des Winters C-Gewinn durch Photosynthese möglich ist, müssen andererseits der von der gefährdeten Wasserbilanz erzwungene Spaltenschluß, der Chlorophyllschwund und die teils klimatisch, teils endogen verursachte Zustandsänderung des Protoplasmas die assimilatorische Leistung wenigstens im Hochwinter stark herabsetzen.

2. Pflanzen unter der Schneedecke

Sie werden nach dem Einschneien — eine Schneehöhe von mehr als einem halben Meter vorausgesetzt — weder von nennenswerten tages- noch von jahreszeitlichen Temperaturschwankungen erreicht. Ihre Temperatur beträgt schon kurz nach dem Einschneien, selbst wenn dabei einiger Frost herrscht, nur wenige Grade unter 0 und steigt im Verlauf des Winters bis zum Gefrierpunkt an. Die Schneedecke wirkt als hervorragender Kälteschutz. Sie leben je nach der Mächtigkeit der Schneedecke im Dämmerlicht oder in fast völliger Dunkelheit. Ihre Wasserbilanz ist nicht gefährdet, mag auch der Boden unter dem Schnee gefroren sein, da die Wassersättigung der Porenluft im Schnee die Transpiration verhindert; Wasserdefizite, die allenfalls vor dem Einschneien entstehen, werden durch Wasseraufnahme rasch wieder ausgeglichen. CO_2 ist in der die Pflanzen umgebenden Poren- und Hohlraumluft hauptsächlich dank der Bodenatmung bis zum 3fachen des Gehaltes über der Schneedecke angereichert, andererseits ist die Luft wahrscheinlich sauerstoffarm. Inwieweit dies die Atmung der Jungzirben beeinflußt, kann nicht abgeschätzt werden. Da Bestrahlung, stärkerer Frost und Austrocknung fernbleiben, sinkt der Chlorophyllspiegel in den eingeschneiten Nadeln im Hochwinter nur unbedeutend; sie bleiben grün, vorausgesetzt, daß der Schneeschutz frühzeitig einsetzt. Ihre Winterruhe ist aus denselben Gründen nicht so tief wie bei Pflanzen, die des Schneeschutzes entbehren[1].

[1] Bei neueren Untersuchungen stellte sich heraus, daß Jungzirben, die ich aus dem Schnee ausgrub, im Laboratorium bei 11°C und 10000 Lux wesentlich rascher zu assimilieren begannen als Vergleichspflanzen, die am Standort nicht schneebedeckt waren.

Die eingeschneiten Pflanzen befinden sich also im Gegensatz zu den aperen in einem Zustand, der Photosynthese möglich erscheinen, ja sogar C-Reingewinn erwarten ließe, wenn ihre Spalten nicht wegen Finsternis geschlossen sind. Doch muß der minimale Lichtgenuß unter der Schneedecke die assimilatorische Leistung begrenzen. Bei den großen Schneemengen, die für Hochlagen selbst im Inneren der Alpen charakteristisch sind, ist aus diesem Grund auch bei eingeschneiten Jungzirben ein nennenswerter C-Erwerb während des Winters nicht zu erwarten.

VII. Der CO_2-Gaswechsel der Zirbe im Winter 1954/55

1. Im Spätherbst bis zum Einsetzen strengen Frostes (23. 10.—14. 11)

In dieser Periode trat zwar bereits regelmäßig Nachtfrost auf, aber in den hellen Stunden überschritt die Nadeltemperatur in der Küvette täglich z. T. noch recht beträchtlich den Gefrierpunkt (Tabelle 6)[1]. Der Niederschlag fiel z. T. als Regen, z. T. als Schnee, der rasch wieder wegschmolz. Der Boden kühlte sich nur nachts einige Male oberflächlich unter 0° C ab und war in der Rhizosphäre der Versuchspflanzen nicht gefroren (Abb. 3).

Demgemäß assimilierten alle Zirben mehr oder weniger lebhaft, wenn der Lichtkompensationswert überschritten wurde und gleichzeitig die Temperatur der Nadeln über —4° C anstieg. Die tiefste Temperatur, bei der CO_2 noch eindeutig gebunden wurde, betrug in diesem Zeitraum —4,7° C.

Die in Tabelle 6 zusammengestellten Tagessummen der Netto-Assimilation waren an einigen Tagen besonders niedrig. Vergleicht man die Assimilation mit der Strahlung und Temperatur so ergibt sich, daß die Photosynthese nicht nur (wie zu erwarten) 1. vom Licht, 2. von der Temperatur direkt begrenzt, sondern 3. auch durch die Nachwirkung von Frost der vorangehenden Nacht gehemmt wurde.

Stellen wir 1. die Assimilationssummen von Tagen, denen eine relativ milde Nachttemperatur voranging (Min $\geq$ —2° C), wo also eine Hemmung der Assimilation nicht zu erwarten war, in Abhängigkeit von der *Strahlungssumme* dar (Abb. 7), so erkennen wir, daß an einigen Tagen, wie etwa am stark bewölkten 25. und 31. 10. (Tabelle 6) die Assimilationsleistung vom Licht begrenzt wurde. Das Lichtoptimum lag bei etwa 130 cal. Im Gegensatz zu den Sommermonaten, in denen dieser Wert auch an stark bewölkten Tagen an unbeschatteten Standorten stets

[1] Die in den Rezipienten eingeschlossenen Zirbennadeln erwärmten sich in der Sonne mehr als im Freien, maximal um 14°, durchschnittlich um 7° C. Trotzdem dürfte der gemessene Gaswechsel auch für freie Zweige gelten, da einerseits der Sonnenschein, daher auch die Erwärmung im Spätherbst nur kurze Zeit andauert, andererseits die Nadeln in allen übrigen Stunden in und außerhalb der Küvette gleich temperiert sind, so daß sich die Tagesmittel nur wenig voneinander unterscheiden (Tabelle 6).

erreicht bzw. überschritten wird, wo also das Licht allein die Tagesassimilation selten begrenzt, bewirkt niedriger Sonnenstand und Verkürzung des Tages, daß bereits im Herbst die optimale Lichtsumme immer häufiger unterschritten wird (vgl. S. 629, Tabelle 5). Besonders ungünstig waren die Lichtverhältnisse bei der Zirbe N_2, die infolge der Hangneigung und -richtung fast stets im Schatten lag, so daß dort vor allem wolkenarme und wolkenlose Tage mit schwacher Lichtzerstreuung außerordentlich strahlungsarm waren (Tabelle 6). Hier litt die Assimilation schon im November täglich an Lichtmangel.

Tabelle 6. *Netto-Assimilationstagessummen ($mgCO_2/gT \cdot d$), -maxima vom 23. 10.—13. 11. 1954. An Tagen, wo die Assimilationswerte fehlen,*

Datum	Witterung	Zirbe W_1							
		Assimilation		Strahlung	Nadeltemperatur				
					in der Küvette			im Freien	
		Σ	Maximum	Σ	Minimum[1]	Maximum	Mittel 6–17[h]	Maximum	Mittel 6–17[h]
23. X.	sonnig	—	—	199	—3,0	21,0	7,8	20,8	9,1
24. 10.	wolkig	20,5	3,3	129	—2,8	21,2	6,6	7,2	2,6
25. 10.	bedeckt	10,2	1,9	42	1,9	7,4	3,5	4,0	1,0
26. 10.	sonnig	—	—	181	—3,2	15,6	3,2	7,3	—1,1
27. 10.	wolkig	—	—	94	—10,3	17,0	2,3	9,0	0,5
28. 10.	wolkig	10,6	2,6	91	—1,0	17,0	6,2	10,8	3,6
29. 10.	sonnig	9,6	2,1	132	—5,2	23,0	6.5	19,0	7,5
30. 10.	wolkig	18,2	2,7	108	—1,5	22,9	11,0	15,9	7,8
31. 10.	bedeckt	11,0	1,6	26	—2,0	4,2	1,4	—2,2	0,5
1. 11.	klar	12,7	2,7	118	—3,4	28,2	6,6	16,0	3,8
2. 11.	wolkig	5,4	1,1	107	—5,6	22,0	4,3	16,9	4,3
3. 11.	wolkig	11,5	2,2	70	—3,5	13,9	4,8	0,3	2,9
4. 11.	sonnig	9,4	2,0	94	—4,0	9,9	0,2	0,5	—2,5
5. 11.	klar	2,7	0,8	114	—8,4	21,8	1,9	11,1	—0,7
6. 11.	sonnig	1,3	0,4	97	—5,3	25,6	6,1	16,8	5,2
7. 11.	wolkig	6,8	1,4	142	—2,0	23,2	8,1	15,8	6,6
8. 11.	wolkig	11,0	1,7	78	—2,5	14,8	6,1	8,8	4,0
9. 11.	wolkig	7,4	1,4	97	—4,5	26,0	3,8	13,0	2,0
10. 11.	bedeckt	10,7	2,0	36	—1,2	4,6	1,7	2,3	0,3
11. 11.	sonnig	7,4	1,5	115	—4,1	15,0	3,5	10,0	0,6
12. 11.	sonnig	—	—	102	—7,7	21,5	4,7	17,0	4,5
13. 11.	sonnig	2,6	0,7	100	—5,0	16,2	2,9	12,2	1,8
Mittel 23. 10.—13. 11.		9,4		103		17,8	4,7	10,8	2,9

[1] Der vorhergehenden Nacht!

Die Leistung eines Tages wird jedoch nicht nur vom Lichtgenuß bestimmt. Wie aus Abb. 7 sichtbar ist, assimilierte die Westzirbe auch bei gleichem Licht deutlich mehr als die Horizontalzirbe und diese wieder stärker als die Nordzirbe. Ohne Zweifel spielt für die Assimilation im Herbst 2. die *Temperatur* eine wichtige Rolle. Stellen wir die Assimilationssummen von Tagen, denen wiederum kein stärkerer Nachtfrost vorherging, in Abhängigkeit vom Temperaturmittel des Zeitraumes von

6—17 Uhr dar (Abb. 8), so wird deutlich, daß das Temperaturoptimum der Assimilationssumme bei 6° C lag; sowohl größere Wärme als auch Kälte — diese allerdings stets gekoppelt mit schwachem Licht — begrenzten die Assimilation direkt.

Von entscheidendem Einfluß auf die Assimilationsleistung eines Tages ist jedoch 3. das *Temperaturminimum der vorhergehenden Nacht.* Seinen Einfluß zeigt Abb. 9. Am 24. 10 betrug die Assimilationssumme der Westzirbe bei einem Temperaturmittel von 6,6° C und einer Strahlungssumme von 129 cal 20,5 mgCO_2/g. Am 27. 10. fiel die Nadeltempe-

(mgCO_2/gT·h) Strahlungstagessummen (cal/cm²·d) und Nadeltemperatur (°C) wurde die Respiration gemessen bzw. war die Registrierung gestört

Zirbe H_2						Zirbe N_2					
Assimilation		Strahlung	Nadeltemperatur in der Küvette			Assimilation		Strahlung	Nadeltemperatur in der Küvette		
Σ	Maximum	Σ	Minimum	Maximum	Mittel 6–17h		Maximum	Σ	Minimum	Maximum	Mittel 6–17h
13,1	2,3	244	—2,0	22,0	10,7	5,2	0,9	74	—2,8	18,5	4,6
—	—	149	—1,3	5,0	2,5	10,5	1,6	99	—2,4	10,8	4,0
8,9	1,7	52	1,3	7,4	2,6	—	—	46	1,1	4,0	1,7
—	—	229	—5,2	19,1	2,9	4,8	0,9	20	—5,4	3,7	—1,7
—	—	129	—10,2	16,9	3,3	2,0	0,5	42	—10,4	12,7	2,6
14,9	2,2	126	—1,0	15,4	6,1	10,0	1,5	99	—0,6	10,9	4,9
6,9	1,2	192	—3,9	28,0	9,6	3,0	0,7	67	—3,6	19,1	3,6
12,7	1,7	177	0,9	23,5	11,1	9,6	1,5	99	—0,5	16,0	7,5
6,3	1,2	36	—1,2	3,4	0,9	5,0	0,8	33	—1,4	3,1	0,8
10,3	1,9	199	—2,8	14,6	5,3	4,8	1,3	39	—2,8	12,4	0,3
10,0	2,0	183	—4,6	16,0	5,1	0,5	0,1	45	—4,6	14,2	1,2
11,1	1,9	95	—2,2	17,0	4,6	0,7	0,2	77	—2,9	13,4	3,9
—	—	192	—3,3	8,0	—0,4	—	—	41	—3,9	0,0	—3,5
2,4	0,5	189	—8,7	17,5	4,2	—	—	25	—8,8	0,9	—2,7
0,8	0,2	176	—3,7	22,5	8,0	0,2	0,1	25	—5,2	6,2	0,8
5,9	1,1	160	—0,8	26,8	9,0	0,3	0,1	44	—1,3	8,5	2,8
10,1	1,6	107	—1,8	23,0	6,2	0,3	0,1	79	—2,6	11,4	3,8
7,1	1,2	115	—3,8	26,0	4,4	0,1	0,02	66	—3,6	9,9	1,5
—	1,7	66	—1,1	4,0	1,3	0,0	—	24	—1,0	4,4	1,4
9,3	1,5	178	—5,0	15,0	3,1	0,0	—	24	—4,9	3,4	—2,2
2,3	0,4	160	—6,6	15,2	5,2	0,0	—	18	—7,1	2,6	—1,4
3,3	0,8	153	—4,0	12,0	2,6	0,0	—	18	—4,7	0,1	—2,7
8,0		150		16,3	4,9	3,2		50		8,5	1,4

ratur in der Nacht bis auf —10,3°. Dieser erste Kälteeinbruch hemmte die Assimilation sehr stark. Die Hemmung hielt am darauffolgenden Tag noch an, obwohl die Nacht mild, der Tag warm (6,2°) und hell (91 cal) war. Sie löste sich erst am 30. 10., ohne daß dabei die ursprüngliche Assimilationsleistung wieder erreicht wurde. Der zweite Kälteeinbruch am 5. und 6. 11. drückte die Netto-Assimilation noch stärker, daß trotz optimaler Tagestemperatur und einer Strahlungssumme von

97 cal nur 1,3 mg CO_2/g · d gebunden wurden. Nach Abb. 7 wäre unter diesen Bedingungen vor der Hemmung eine Assimilation von rund 17 mg zu erwarten gewesen! Bei der Wiedererwärmung am 7. und 8. 11. stieg die Assimilation nur langsam an und blieb auch in den nachfolgenden Tagen, die keine nennenswerten Fröste brachten, wiederum niedriger als nach der ersten Kältewelle. Genau so wirkte der dritte Kälteeinbruch (12. und 13. 11.).

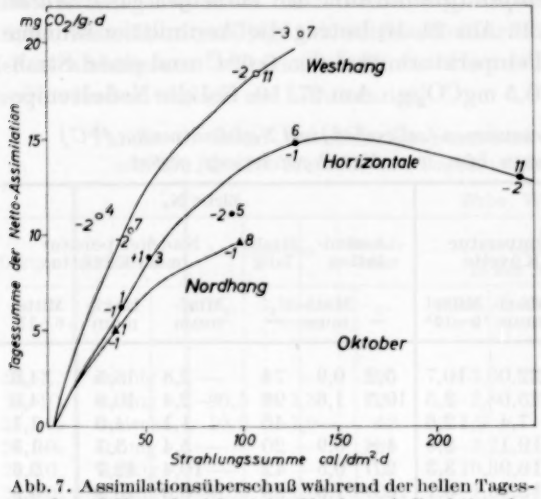


Abb. 7. Assimilationsüberschuß während der hellen Tagesstunden (3 Versuchszirben) im Oktober als Funktion der Strahlungssumme. Den Meßtagen ging entweder kein oder nur schwacher Nachtfrost voraus. Die links bzw. unter jedem Meßpunkt stehende Zahl gibt das Nadeltemperaturminimum der vorhergehenden Nacht, die rechts bzw. über jedem Meßpunkt stehende Zahl das Nadeltemperaturmittel der hellen Tagesstunden (6—17 h) an. Das Datum der Meßtage kann auf Grund der eingetragenen Meßwerte aus Tabelle 6 entnommen werden

Die Zirbe scheint bei Frost, besonders unter —8° C gewisse Veränderungen zu erfahren, die der Assimilation eine obere Grenze setzen, bei Wiederholung des Frostes tiefer greifen und so die Assimilation immer mehr erschweren. Die Erwärmung am Tage wirkt im umgekehrten Sinne, d. h. sie aktiviert den Assimilationsapparat wieder, ohne jedoch die Hemmung völlig aufheben zu können.

In diesem Licht gesehen wird klar, warum

Tabelle 7

Netto-Assimilation (mg CO_2/g T)	Zirbe			
	W_1	H_2	N_2	Nr. 22 (1953)
Ende September:				
Größtes Stundenmaximum . . .	—	—	—	3,1
Größte Tagessumme	—	—	—	20,3
Ende Oktober:				
Größtes Stundenmaximum . . .	3,3	2,3	1,6	—
Größte Tagessumme	20,5	14,9	10,5	—
Mai:				
Größtes Stundenmaximum . . .	3,9	3,5	2,8	—
Größte Tagessumme	34,4	34,6	27,1	—

selbst die höchste Assimilation der Horizontal- und Nordhangzirbe in dieser Periode deutlich unter den Beträgen lag, die ich ein Jahr früher an einer Waldlichtungszirbe Ende September ermittelte (TRANQUILLINI

1955, Abb. 3 und 7), bzw. unter den noch eingehend zu besprechenden Assimilationswerten derselben Zirben nach der Ausaperung im Mai des folgenden Jahres (Tabelle 7).

Aufzeichnungen der Lufttemperatur (Hütte) vor Einsetzen der Assimilationsversuche ergaben nämlich, daß sie bereits Ende September 2mal für je 3 Tage unter den Gefrierpunkt sank und nach kurzer Wiedererwärmung Anfang Oktober für eine ganze Woche unter 0° blieb und am kältesten Tag —5° C erreichte. Unter dem Einfluß dieser schwachen Fröste, die in Bodennähe verstärkt sind (vgl. S. 620) hatten die Pflanzen bereits ihre sommerliche Aktivität verloren und befanden sich auf dem Wege zur winterlichen Ruhestimmung, was auch die bereits Mitte September eintretende Regulation des osmotischen Wertes bestätigt (vgl. S. 632, Abb. 5). Es wird auch klar, warum die Reduktion der Assimilation bei der am wärmeren Westhang stockenden Zirbe W_1 weniger fortgeschritten war als bei den Pflanzen der kühleren Standorte, vor allem des Nordhanges. Je wärmer der Standort am Tage (Tabelle 3) desto wirkungsvoller wird die Hemmung durch die nächtliche Kälte wieder aufgehoben.

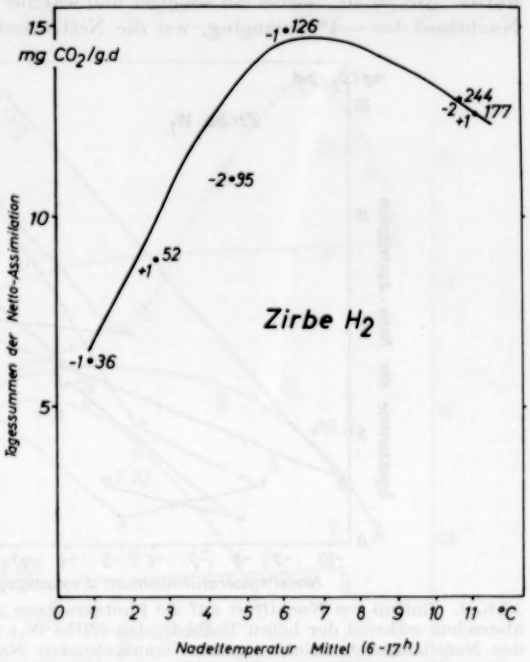


Abb. 8. Assimilationsüberschuß während der hellen Tagesstunden (Zirbe H_2) im Oktober als Funktion der mittleren Nadeltemperatur (6—17 h). Den Meßtagen ging entweder kein oder nur schwacher Nachtfrost voraus. Die links bzw. unter jedem Meßpunkt stehende Zahl gibt das Nadeltemperaturminimum der vorhergehenden Nacht, die rechts bzw. über jedem Meßpunkt stehende Zahl die Strahlungssumme des Tages an

Die in den folgenden Tagen hinein sich dehnende Nachwirkung von Nachtfrost, unteroptimale Tagestemperatur und abnehmende Helligkeit bewirken, daß die Assimilation im Spätherbst abnimmt.

Diese Wechselwirkung von Wärme und Kälte auf den CO_2-Gaswechsel läßt sich im einzelnen noch genauer verfolgen, wenn man den Tagesverlauf der Netto-Assimilation in Abhängigkeit von der Strahlung und Temperatur darstellt (Abb. 10).

Am 23. 10. herrschte am Tag sonniges, warmes Wetter, in der vorangehenden Nacht war schwacher Frost bis —2°. Die Assimilation stieg erwartungsgemäß mit der Strahlung zunächst steil, dann (über 15 cal) nur mehr flach an; erst um die Mittagszeit wurde sie deutlich aktiviert, obwohl das Licht bereits fiel und die Temperatur gleichblieb. Die Kurve zieht eine Schleife nach oben, d. h. die Assimilation war in den Vormittagsstunden unter der Nachwirkung des vorausgegangenen Nachtfrostes gehemmt und erst infolge der Mittagswärme (19°) lebhafter. Am 29. 10., wieder ein sonniger und warmer Tag, dem jedoch ein schärferer Nachtfrost bis —4° voranging, war die Netto-Assimilation noch viel stärker ge-

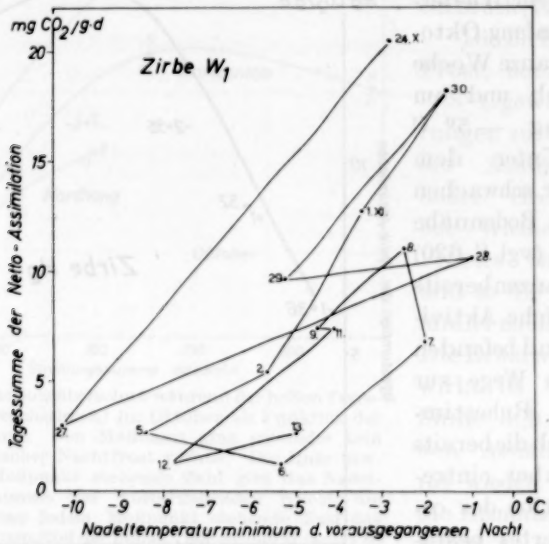


Abb. 9. Einfluß von Nachtfrost auf die Photosynthese am folgenden Tag. Assimilationsüberschuß während der hellen Tagesstunden (Zirbe W_1) vom 24. 10.—13. 11. als Funktion des Nadeltemperaturminimums der vorausgehenden Nacht. Die Meßwerte wurden entsprechend der zeitlichen Reihenfolge miteinander verbunden. Tage, an denen das Licht die Assimilation begrenzte, wurden in die Figur nicht aufgenommen

hemmt. Bei hoher Strahlung und Temperatur verläuft ihre Kurve an diesem Tag nicht waagrecht bzw. sanft ansteigend, sondern fällt deutlich ab. Dieser Abfall ist darauf zurückzuführen, daß starkes Licht stets mit relativ hoher Temperatur in der Küvette gekoppelt ist, also gesteigerte Atmung verursacht und diese vom Nachtfrost lange nicht so nachhaltig beeinflußt wird wie die Photosynthese.

Am 5. 11., ein klarer, etwas kühlerer Tag nach starkem Nachtfrost bis —9°, stieg die Assimilation mit dem Licht nur sehr schwach an und blieb über 10 cal auf gleicher Höhe. Der Abfall im Bereich hohen Lichtes fehlte, obwohl die Temperatur 15° erreichte. Vermutlich hat die starke Kälte jetzt auch die Atmung in Mitleidenschaft gezogen, so daß sie die Assimilation weniger beeinträchtigt.

Am 6. und 7. 11. milderte sich die Frostlage, Assimilation und Atmung stiegen wieder an, letztere jedoch rascher und stärker, so daß sich das Kurvenende wieder stark nach unten krümmte und um die Mittagszeit der Kompensationslinie näherte bzw. sie unterschritt (CO_2-Ausscheidung bei Licht, negative Netto-Assimilation).

Die Darstellung des Tagesgangs der Netto-Assimilation ausgewählter Tage der herbstlichen Übergangsperiode gestattete uns einen tieferen

Einblick, wie die Temperatur die Brutto-Assimilation und die Atmung beeinflußt: Nach schwachem Frost wird zunächst nur die Assimilation merklich gehemmt, bei stärkerem Frost auch die Atmung. Bei Wiedererwärmung wird umgekehrt zuerst die Atmung aktiviert, erst bei längerer Einwirkung auch die Assimilation, letztere aber deutlich

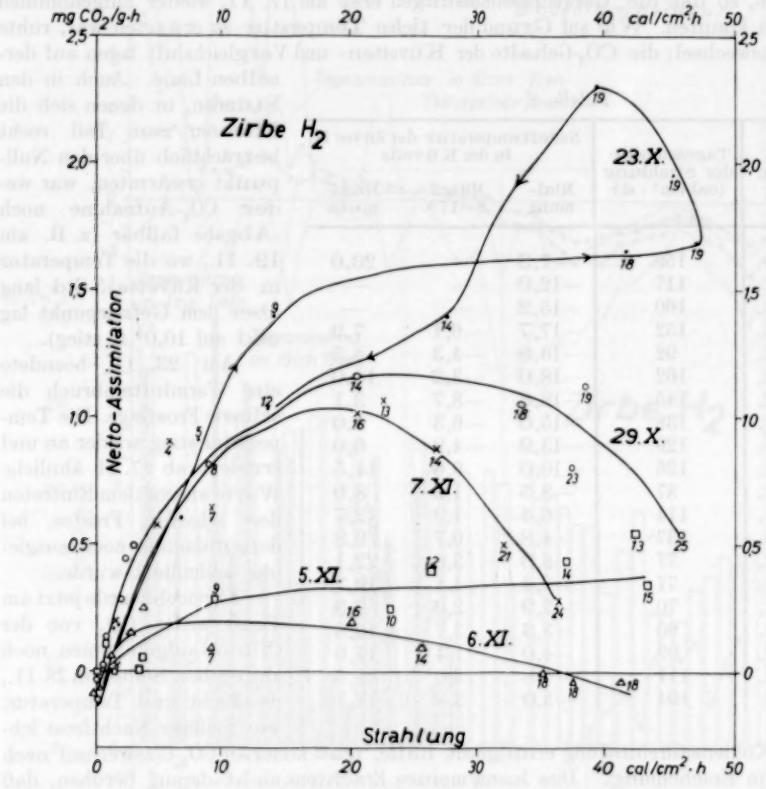


Abb. 10. Charakteristische Tagesgänge der Netto-Assimilation im Übergang vom Spätherbst zum Winter als Funktion der Strahlung (Zirbe H_2). Die eingetragenen Meßwerte sind Stundenmittel, die den Punkten zugeordnete Zahl gibt das Stundenmittel der Nadeltemperatur in der Küvette an

schwächer[1]. Das Verhältnis zwischen beiden kann sich dabei so zuungunsten der Assimilation verschieben, daß die CO_2-Stundenbilanz vorübergehend negativ wird.

Daß der Assimilationsapparat gegen Kälte empfindlicher ist als das Atmungssystem, ist für den Gaswechsel im Hochwinter von entscheidender Bedeutung.

[1] Dasselbe beobachtete ZELLER (1951), als sie inaktive Fichtenzweige ins warme Zimmer brachte.

2. Frühwinter bis zum Einschneien (14. 11.—6. 12.)

Am 15. 11. setzte scharfer Frost ein, der eine Woche lang anhielt. Die Nadeltemperatur sank bis gegen —20°. Am Tage überschritt sie in der Küvette selbst jetzt noch regelmäßig den Gefrierpunkt, doch meist nur für kurze Zeit, so daß das Temperaturmittel der hellen Tagesstunden einige Grade unter Null lag (Tabelle 8).

Infolge Ausfalls einer Verstärkerröhre war der *Uras* vom 14.—16. 11. außer Betrieb, so daß die Gaswechselmessungen erst am 17. 11. wieder aufgenommen werden konnten. Wie auf Grund der tiefen Temperatur zu erwarten war, ruhte der Gaswechsel; die CO_2-Gehalte der Küvetten- und Vergleichsluft lagen auf derselben Linie. Auch in den Stunden, in denen sich die Pflanzen zum Teil recht beträchtlich über den Nullpunkt erwärmten, war weder CO_2-Aufnahme noch -Abgabe faßbar (z. B. am 19. 11., wo die Temperatur in der Küvette 5 Std lang über dem Gefrierpunkt lag und auf 10,0° C stieg).

Tabelle 8

Datum	Tagessumme der Strahlung (cal/cm² · d)	Nadeltemperatur der Zirbe H_2 in der Küvette		
		Minimum	Mittel 6—17h	Maximum
14. 11.	159	—7,3	—	20,0
15. 11.	117	—12,0	—	—
16. 11.	160	—15,2	—	—
17. 11.	152	—17,7	—6,1	7,9
18. 11.	92	—16,0	—4,3	4,5
19. 11.	162	—18,0	—3,2	10,0
20. 11.	145	—18,6	—8,7	3,1
21. 11.	138	—15,0	—6,3	4,0
22. 11.	129	—13,9	—4,8	6,0
23. 11.	126	—10,0	0,6	11,5
24. 11.	87	—8,5	1,2	8,0
25. 11.	114	—6,4	1,9	12,7
26. 11.	137	—4,8	0,7	9,8
27. 11.	77	—3,0	3,0	22,1
28. 11.	77	—2,4	4,1	10,7
29. 11.	70	—2,9	3,0	8,3
30. 11.	90	—3,3	3,7	16,8
1. 12.	99	—4,0	1,4	17,0
2. 12.	111	—4,8	3,0	18,5
3. 12.	104	—5,0	3,8	18,1

Am 23. 11. beendete ein Warmlufteinbruch die scharfe Frostlage. Die Temperatur stieg wieder an und erreichte ab 27. 11. ähnliche Werte wie vor dem Eintreten des scharfen Frostes, bei denen damals noch ausgiebig assimiliert wurde.

Dennoch wurde jetzt am Tage weder CO_2 von der Pflanze aufgenommen noch abgegeben. Selbst am 28. 11., da Licht und Temperatur, wie mäßiger Nachtfrost lebhafte Kohlensäurebindung ermöglicht hätte, trat keinerlei CO_2-Gaswechsel nach außen in Erscheinung. Dies kann meines Erachtens nicht darauf beruhen, daß sowohl die Assimilation als auch die Atmung völlig stillag, da zumindest letztere unter dem Einfluß der Wärme wieder aufleben müßte. Sie war auch tatsächlich in der relativ warmen Nacht zum 29. 11. deutlich nachzuweisen. Am Tage wurde jedoch das bei der Atmung freiwerdende Kohlendioxyd sofort wieder reassimiliert. Der Gaswechsel ruhte also nur scheinbar und spielte sich im Innern der Nadeln ab.

Daß die Assimilation unter den wechselnden klimatischen Verhältnissen dieser Periode bis zum Einschneien *niemals* das Übergewicht über die Atmung bekam, sondern *stets* nur gerade kompensierte, kann kein Zufall sein und läßt sich nur dadurch erklären, daß infolge Spaltenschluß von außen her kein CO_2 ins Blatt eintreten konnte (STÅLFELT 1935, PISEK und WINKLER 1956). Daß die Atmung in den hellen und warmen Stunden der Tage niemals das Übergewicht über die Brutto-Assimilation bekam, beweist, daß letztere stets das gesamte durch die Atmung gebildete CO_2 im Inneren des Blattes zu reassimilieren imstande war.

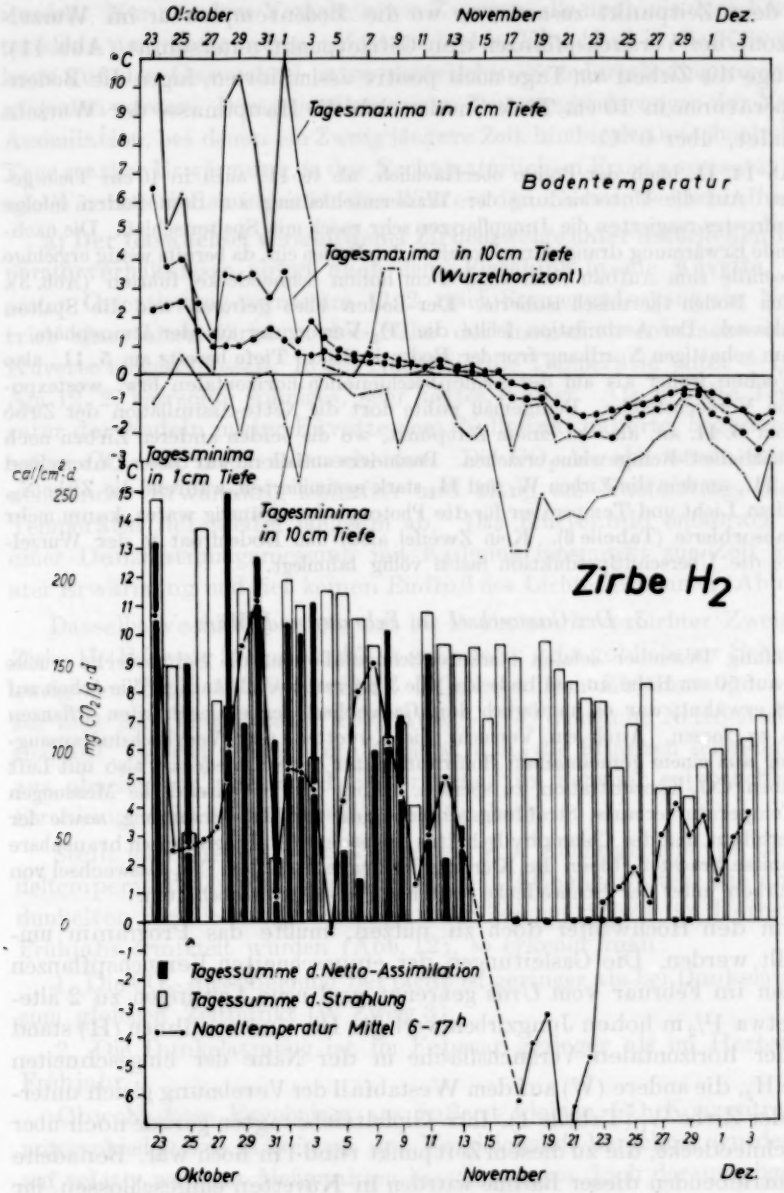


Abb. 11. Eindringen des Bodenfrostes in den Wurzelhorizont (10 cm) setzt die Netto-Assimilation auf Null herab. Assimilation (H_2), Strahlung, Nadel- und Bodentemperatur vom Oktober bis Dezember. An Tagen, wo die Säulen, die die Assimilationssummen angeben, völlig fehlen, war die CO_2-Registrierung gestört, wo an ihre Stelle ein Punkt auf der Nullinie eingetragen ist, war der Netto-Gaswechsel nach außen nicht mehr nachweisbar (Kompensation)

Der plötzliche Stillstand der Netto-Assimilation fiel ziemlich genau mit dem Zeitpunkt zusammen, wo die Bodentemperatur im Wurzelhorizont der Versuchspflanzen den Gefrierpunkt unterschritt (Abb. 11). Solange die Zirben am Tage noch positiv assimilierten, lagen die Bodentemperaturen in 10 cm Tiefe, in der sich die Hauptmasse der Wurzeln befindet, über 0° C.

Ab 14. 11. blieb der Boden oberflächlich, ab 16. 11. auch in 10 cm Tiefe gefroren. Auf die Unterbindung der Wassernachleitung aus dem Boden infolge Bodenfrostes reagierten die Jungpflanzen sehr rasch mit Spaltenschluß. Die nachfolgende Erwärmung drang nur schwach in den Boden ein, da bereits wenig ergiebige Schneefälle zum Aufbau einer rund 4 cm hohen Schneedecke führten (Abb. 3), die den Boden thermisch isolierte. Der Boden blieb gefroren und die Spalten geschlossen. Der Assimilation fehlte die CO_2-Versorgung aus der Atmosphäre.

Am schattigen Nordhang fror der Boden in 10 cm Tiefe bereits am 5. 11., also $1^1/_2$ Wochen früher als auf der sonnenbeschienenen horizontalen bzw. westexponierten Versuchsfläche. Demgemäß ruhte dort die Netto-Assimilation der Zirbe N_2 vom 6. 11. an, also zu einem Zeitpunkt, wo die beiden anderen Zirben noch beträchtliche C-Reingewinne erzielten. Besonders auffallend war dieser Unterschied am 8. 11., an dem die Zirben W_1 und H_2 stark assimilierten, während die Zirbe N_2, trotzdem Licht und Temperatur für die Photosynthese günstig waren, kaum mehr CO_2 absorbierte (Tabelle 6). Kein Zweifel also, daß Bodenfrost in der Wurzelsphäre die Überschußproduktion rasch völlig lahmlegt.

3. Der Gaswechsel im Februar und März

Anfang Dezember setzten stärkere Schneefälle ein, die Schneedecke wuchs rasch auf 50 cm Höhe an und bedeckte alle 3 Küvetten vollständig. Wie schon auf S. 618 erwähnt, war es unmöglich den Gaswechsel der eingeschneiten Pflanzen exakt zu fassen. Auch ein Versuch, die Küvetten- und Vergleichsluftansaugöffnung aus einem gemeinsamen Hohlraum unter der Schneedecke, also mit Luft derselben CO_2-Konzentration zu speisen, schlug fehl. Während die Messungen des Temperaturverlaufs, Strahlungsgenusses und der CO_2-Versorgung, sowie der Wasserbilanz und des Chlorophyllgehaltes eingeschneiter Jungpflanzen brauchbare Ergebnisse brachten, bleibt die Klärung der Frage nach dem CO_2-Gaswechsel von Jungzirben unter der Schneedecke späteren Versuchen vorbehalten.

Um den Hochwinter doch zu nützen, mußte das Programm umgestellt werden. Die Gasleitungen der eingeschneiten Versuchspflanzen wurden im Februar vom *Uras* getrennt und neue Leitungen zu 2 älteren, etwa $1^1/_2$ m hohen Jungzirben verlegt. Die eine von ihnen (H) stand auf der horizontalen Versuchsfläche in der Nähe der eingeschneiten Zirbe H_2, die andere (W) auf dem Westabfall der Verebnung gleich unterhalb der Zirbe W_1 (Tabelle 1). Ihre Gipfeltriebe ragten gerade noch über die Schneedecke, die zu diesem Zeitpunkt rund 1 m hoch war. Benadelte Seitentriebenden dieser Bäume wurden in Küvetten eingeschlossen, ihr Gaswechsel, ihre Nadeltemperatur sowie die Strahlung registriert. Da die Abschirmung der direkten Strahlung durch BG-21-Filter, wie schon erwähnt, fast unwirksam war und stärkere Pumpen noch nicht zur Verfügung standen, erwärmten sich die Nadeln in den Küvetten am Tage

stark. Aus diesem Grunde mußten die Versuchszweige öfters gewechselt werden. Nur aus dem Verhalten von Zweigen, die noch nie dem Küvettenklima ausgesetzt waren, sofort nach dem Einschluß in die Küvetten kann auf den Gaswechsel unter natürlichen Standortsbedingungen geschlossen werden. Demgegenüber zeigen Dauerregistrierungen der Netto-Assimilation, bei denen ein Zweig längere Zeit hindurch abwechselnd am Tage starker Erwärmung, in der Nacht natürlichem Frost ausgesetzt war, wie Wärmeperioden inmitten des Winters den Gaswechsel beeinflussen.

a) Der Gaswechsel verschiedener Zirbenzweige unter natürlichen Temperaturverhältnissen sofort nach dem Einschluß in die Küvette. Zur ersten Orientierung wurde am 11. 2. nach Sonnenuntergang ein Nadeltrieb einer alten Zirbe in der Nähe der Instrumentenbaracke in die Küvette eingeschlossen. In der Nacht fiel die Temperatur unter —13° C. Am 12. 2. herrschte sonniges, sehr kaltes Wetter. Als sich die Temperatur der Nadeln in der Küvette dem Nullpunkt näherte, begannen sie sofort CO_2 bei Licht auszuscheiden. Die CO_2-Abgabe wurde mit zunehmender Erwärmung lebhafter und klang am Nachmittag, als die Temperatur fiel wieder langsam ab. Das Kurvenbild entsprach dem einer Dunkelatmungsmessung mit Kulminationspunkt zur Zeit stärkster Erwärmung und ließ keinen Einfluß des Lichtes erkennen (Abb. 12).

Dasselbe Verhalten zeigte am 14. 2. ein stark verfärbter Zweig der Zirbe H (H Zweig 2) und am 15. 2. ein relativ grün gebliebener Schattenzweig der Zirbe W (W Zweig 3). Alle geprüften Zirbenzweige wiesen zur Zeit bei Temperaturen über etwa —2° C deutliche Netto-Assimilation auf; sie war jedoch stets negativ, d. h. die Pflanzen scheiden CO_2 aus, obschon sie genügend Licht erhalten (im Februar entsprechen die Strahlungsverhältnisse denen vom Oktober).

Stellt man die Netto-Gaswechselwerte in Abhängigkeit von der Nadeltemperatur dar und vergleicht sie mit Atmungswerten, die an verdunkelten Parallelzweigen zum gleichen Zeitpunkt bzw. im Herbst und Frühjahr ermittelt wurden (Abb. 12), so erkennt man:

1. Die CO_2-Ausscheidung bei Licht ist geringer als bei Dunkelatmung zum gleichen Zeitpunkt (W Zweig 3).

2. Die Dunkelatmung ist im Februar geringer als im Herbst und Frühjahr.

Obwohl diese Ergebnisse aus äußerst kleinen CO_2-Konzentrationsunterschieden von Küvetten- und Vergleichsluft berechnet wurden und auf relativ wenigen Meßpunkten beruhen, kann doch daraus abgeleitet werden, daß im Februar

1. bei Temperaturen unter —2° C der Gaswechsel völlig ruht,

2. die Atmung (gemessen im Dunkeln) gegenüber Herbst und Frühjahr deutlich reduziert ist und

3. die Brutto-Assimilation (gemessen als Differenz von Dunkelatmung und CO_2-Ausscheidung bei Licht) zwar nicht völlig stillgelegt, jedoch so stark gehemmt ist, daß sie selbst bei optimalem Licht und Temperatur die gleichzeitig stattfindende Atmung nicht kompensieren kann.

Während noch im Dezember die Gesamtphotosynthese ausreichte, um das durch die Atmung gebildete CO_2 vollständig zu reassimilieren,

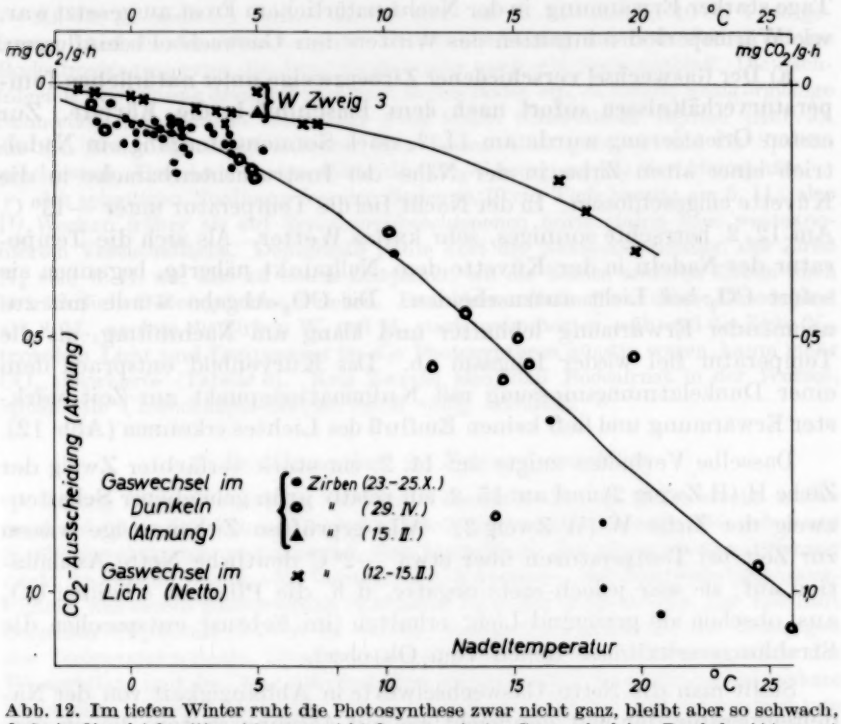


Abb. 12. Im tiefen Winter ruht die Photosynthese zwar nicht ganz, bleibt aber so schwach, daß sie die gleichzeitige Atmung nicht kompensiert. Gaswechsel im Dunkeln (Atmung) zu verschiedenen Jahreszeiten und Gaswechsel im Licht (CO_2-Ausscheidung) im Februar in Abhängigkeit von der Nadeltemperatur. Stundenmittel

ist sie nun im Februar so schwach, daß sie nur mehr einen kleinen Teil der Atmungskohlensäure verarbeiten kann; der andere Teil verläßt das Blatt und wird bei der Gaswechselprüfung meßbar.

Diese überaus starke Reduktion der Photosynthese dürfte durch die winterliche Kälte hervorgerufen werden. Wie bereits früher ausgeführt wurde, assimilierten Zirben im Herbst nach jedem stärkeren Frost schwächer als vorher, wodurch die Assimilation entsprechend mehreren Kältewellen stufenförmig abnahm. Im Dezember und Januar wurden 5 stärkere Kältewellen registriert, die mehrmals Lufttemperaturen (Hütte) unter -10^0 brachten, einmal im Januar -18^0 C (Abb. 3). Auch in den milderen Zwischenzeiten blieben die Temperaturen wesentlich

niedriger als im November. Durch die wiederholten starken Fröste und die geringe Erwärmung am Tage im Dezember und Januar haben die Pflanzen einen Zustand erreicht bei dem ihr Photosyntheseapparat auch in optimalem Licht und Temperatur nur mehr äußerst schwach funktioniert. Für die Annahme, daß der Chlorophyllschwund der Nadeln, der im Januar und Februar den Höhepunkt erreicht, daran beteiligt ist, spricht der Befund, daß der Zweig 3 der Zirbe W, der aus dem beschatteten Teil des Gipfels stammte, deutlich grüner war und mehr Chlorophyll enthielt, als die anderen geprüften Zweige der Kronensonnenseite, bei gleicher Temperatur weniger CO_2 abgab, also mehr Atmungskohlensäure reassimilierte als diese.

Der Umstand, daß der Boden im Februar bis in 40 cm Tiefe gefroren war, die Spaltöffnungen daher noch immer geschlossen sein mußten, ist jedoch im Gegensatz zum Dezember nunmehr ohne Belang, da die Photosynthese bei keinem Zweig ausreichte, auch nur das in den Intercellularen vorliegende CO_2 vollständig zu verarbeiten, die Atmungskohlensäure hingegen fast unbehindert auch durch geschlossene Spaltöffnungen aus den Nadeln ausströmen kann (Pisek und Winkler 1956).

b) Der Gaswechsel bei Dauereinschluß eines Zirbenzweiges in die Küvette. Der am 14. 2. erstmalig untersuchte Zweig 2 der Zirbe H blieb bis 23. März, also fast $1^1/_2$ Monate in der Küvette. Seine Temperatur überschritt in dieser Zeit täglich 10°, öfters 20°, einige Male sogar 30°C. In der Nacht kühlte er sich jedoch fast stets unter —10°, einmal sogar unter —20°C ab. Vergleicht man diese Werte mit den Temperaturen eines freien Vergleichszweiges, so zeigt sich, daß sich die Minima nur wenig voneinander unterscheiden, die Maxima jedoch in der Küvette um rund 20° höher lagen als im Freien.

Trotz dieser enormen Überhitzung am Tage, die mit zunehmender Sonnenscheindauer immer längere Zeit anhielt, blieb der Gaswechsel in der ganzen Periode negativ, d. h. die Atmung wurde niemals von der Assimilation überkompensiert. Im Gegenteil: Die CO_2-Ausscheidung wurde gleich in den ersten Tagen des Einschlusses in die Küvette lebhafter und erreichte am 25. 2. vorübergehend sogar größere Werte wie die Dunkelatmung von Zweigen im frühherbstlichen Zustand bei gleicher Temperatur (Abb. 13). Die Überwärmung stimulierte offenbar die Atmung, während die Brutto-Assimilation darauf zunächst noch nicht reagierte.

Erst im März begann auch diese anzusteigen, obwohl die Nachtfröste noch unvermindert anhielten. Am 9. 3., also am 24. Tag des Einschlusses in die Küvette, war die CO_2-Ausscheidung bereits am Vormittag wesentlich geringer als in den Tagen vorher. Am Nachmittag nahm sie weiter ab. Die Kurve des CO_2-Gaswechseltagesgangs in Abhängigkeit von der Nadeltemperatur beschrieb ähnlich wie am 23. 10. (Abb. 4) eine Schleife nach oben, die anzeigt, daß sich die Hemmung der Photosynthese im Laufe des Tages langsam löste.

Am 20. 3 war die Brutto-Assimilation dann soweit aktiviert, daß sie die Atmung kurz vor dem Einbruch der Dunkelheit gerade kompensierte. Dabei blieb es auch an den folgenden warmen Tagen, wahrscheinlich weil der Boden noch 45 cm tief gefroren, die Spalten daher noch immer geschlossen waren.

Als Ende März der Zweig 2 der Zirbe H aus der Küvette kam, in der er sich fast $1^1/_2$ Monate befand, war er grün; seine Farbe unterschied

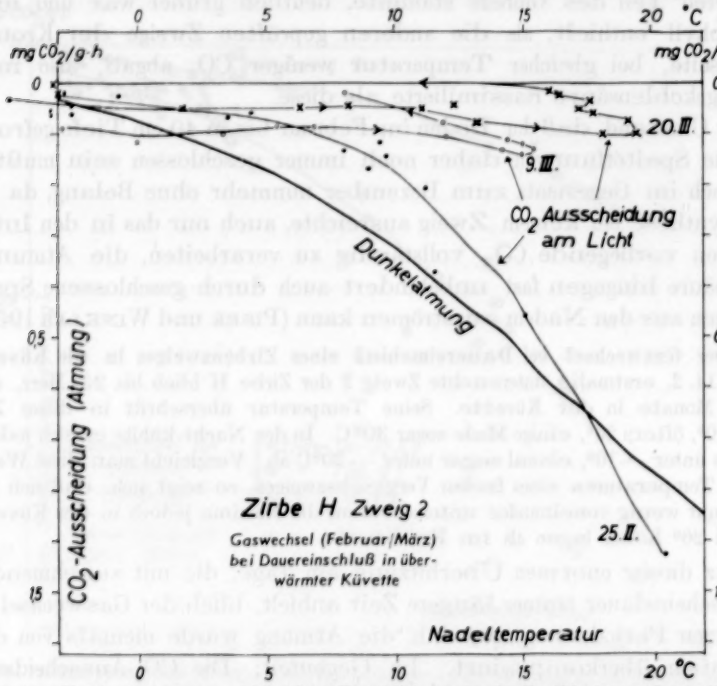


Abb. 13. Fortsetzung von Abb. 12. Allmählich erstarkt die Photosynthese. Netto-Gaswechsel eines Zweiges, der seit 14. 2. in der Küvette eingeschlossen war, in Abhängigkeit von der Nadeltemperatur an ausgewählten Tagen im Februar und März. Die Meßwerte vom 9. und 20. 3. wurden entsprechend ihrer zeitlichen Reihenfolge miteinander verbunden (Schleifenkurven). Zum Vergleich wurde die Dunkelatmungskurve aus Abb. 12 übertragen

sich deutlich von der seiner frei exponierten Nachbarzweige. Sonach dürfte die Regeneration des Chlorophylls an der Aktivierung der Assimilation maßgeblich beteiligt sein. Die ständigen Nachtfröste sorgen dafür, daß es mit letzterer trotz der Erwärmung untertags nicht so geschwind vorangeht. Bringt man inaktive Zweige im Hochwinter ins Zimmer (16—20°), beginnen sie in wenigen Tagen im Überschuß zu assimilieren, viel rascher als im Freien in den überwärmten Küvetten, weil es im Zimmer keinen Frost gibt. Es kommt jedoch auch hier nicht zu sommerlicher Höchstleistung. Ähnlich wie die Frosthärte der Zirben, wenn man Zweigproben im Hochwinter bei 10—20° hält, niemals auf

sommerliche Tiefstwerte heruntergeht (PISEK und SCHIESSL 1947), bleibt auch bei der Assimilation der innere Jahresrhythmus spürbar (PISEK und WINKLER 1957).

Der Gaswechsel, den wir an dem lange Zeit in der Küvette eingeschlossenen Zweig feststellten, ist nicht auf frei exponierte Zweige übertragbar, wirft aber doch Licht auf deren Verhalten und gestattet Schlüsse auf ihre CO_2-Bilanz, wenn ihr Temperaturverlauf bekannt ist.

Im März erwärmten sich die Nadeln an der Kronensüdseite in der Nähe der Schneeoberfläche an 24 Tagen über 0° C, an 6 Tagen sogar über 10° C (Tabelle 2 und Abb. 3). Mit Ausnahme der 7 Eistage dürften also die Zirben an den übrigen Tagen entsprechend der Höhe und Andauer der Temperatur mindestens im Ausmaß, das durch die obere Kurve der Abb. 12 festgelegt ist, CO_2 ausgeschieden haben. In Wärmeperioden, in denen mehrere Tage hindurch der Gefrierpunkt weiter und länger überschritten wurde, mag die CO_2-Ausscheidung infolge Atmungssteigerung Beträge erreicht haben, die zwischen den beiden Kurven in Abb. 12 liegen, wogegen mit einem Anstieg der Brutto-Assimilation unter den Temperaturverhältnissen freier Zweige im März sicher nicht zu rechnen ist. Darauf läßt sich schon aus der gelblichen Winterfärbung schließen, die die Zweige bis Ende des Monats behielten.

Es wäre Irrtum wollte man annehmen, daß Jungzirben in Hochlagen Wärmeperioden inmitten des Winters zu Stoffgewinn nützen können. Vielmehr führt stärkere Erwärmung, vor allem wenn sie länger anhält, zu bedeutendem Stoffverlust.

4. Der Gaswechsel im April

Ende März setzte Tauwetter ein. Die Lufttemperatur blieb 4 Tage lang auch in der Nacht über dem Gefrierpunkt. Die Schneedecke begann zu schmelzen, das Wasser drang in den Boden und taute ihn bis nahe zur Oberfläche auf. Die Nadeln erwärmten sich sonnseitig bis auf + 20°C (Abb. 3). Dennoch blieb der Gaswechsel eines Zweiges der Zirbe W (Nr. 5), der am 1. 4. abends zum erstenmal in die Küvette kam, am sonnig warmen 2. 4. während des ganzen Tages negativ. Die CO_2-Ausscheidung war am Vormittag nach kalter Nacht (—12°) äußerst gering und entsprach der vom 14. 2.; nachmittags wurde sie stärker, so daß die Tageskurve des Gaswechsels, als Funktion der Strahlung aufgetragen, nun eine Schleife nach unten beschrieb (Stimulation der Atmung!), wovon am 14. 2. nichts bemerkbar war (Abb. 14a).

Zirben, die in ihrem Naturklima standen, zeigen also Anfang April immer noch negative CO_2-Bilanz, doch hatte das warme Wetter und das vorübergehende Ausbleiben von Nachtfrösten die Winterstarre bereits gelockert: Im Februar mußte in den Küvetten 10—20° Wärme mehrere Tage auf die Versuchsobjekte einwirken, um die Atmung zu stimulieren, jetzt braucht es dazu nur mehr wenige Stunden.

Der weitere Verlauf des Gaswechsels dieses Zweiges bei längerem Verweilen in der Küvette zeigte, daß auch die Photosynthese im April

bedeutend rascher anstieg als in den Monaten Februar und März. Während der Zweig 2 der Zirbe H im Februar über einen Monat tägliche Erwärmung brauchte, bis seine Assimilation die Atmung kompensierte, erreichte die Photosynthese des Zweiges 5 der Zirbe W jetzt schon am 2. Tag seines Einschlusses in die Küvette (am 3. 4.) kurz vor Sonnenuntergang dieselbe Höhe wie die gleichzeitige Atmung und am nächsten Tag (4. 4.) wurde die Netto-Assimilation zum erstenmal seit dem 13. November wieder positiv. Die Spalten hatten sich also bereits geöffnet, was nach dem Auftauen des Wassers im Boden und durch die Zunahme des Wassergehaltes der Nadeln um diese Zeit durchaus möglich und für die Wasserbilanz wieder ungefährlich war.

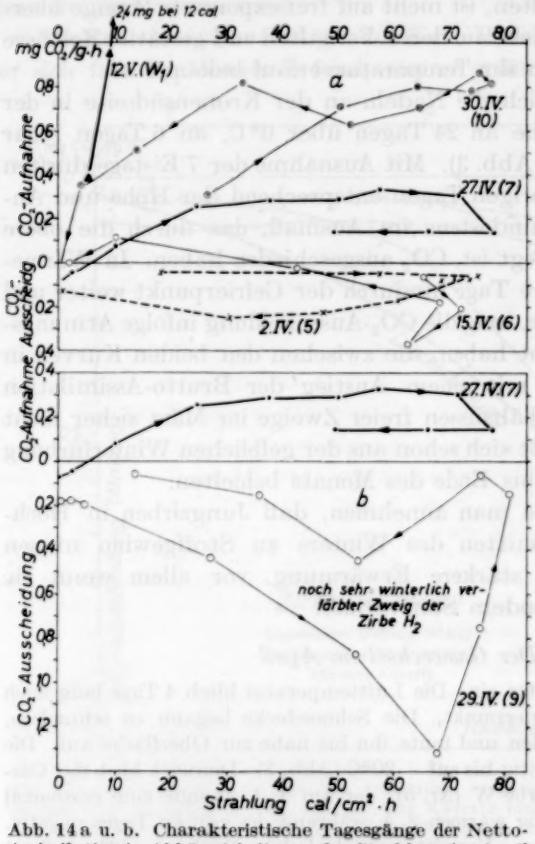


Abb. 14 a u. b. Charakteristische Tagesgänge der Netto-Assimilation in Abhängigkeit von der Strahlung im April und Mai. a Im Laufe des April wird die Photosynthese (bei gleicher Strahlung) immer lebhafter. b Vergleich zwischen der Netto-Assimilation eines grünen Zweiges von der Nordseite der Krone mit jener eines noch stark winterlich verfärbten Zweiges von der Südseite desselben Baumes bei gleicher Strahlung

In der ersten Aprilhälfte hielt mit Ausnahme einiger Tage die milde Witterung an, der Chlorophyll- und Wassergehalt der Nadeln nahm bereits stark zu. Trotzdem zeigte ein neuer Zweig (W-Zirbe Zweig 6) am 15. 4. sofort nach Einschluß in die Küvette um 12 Uhr Mittag immer noch CO_2-Ausscheidung. Sie stieg innerhalb der nächsten 2 Stunden sogar stark an, fiel in den folgenden Stunden wieder ab und ging um 17 Uhr in CO_2-Bindung über (Abb. 14a). Der Steigerung der Atmung folgte die Aktivierung der Brutto-Assimilation an diesem Tag viel rascher als Anfang April (Tabelle 9).

Immer noch war der Gaswechsel unmittelbar nach dem Einschluß in die überwarme Küvette negativ. Der Zweig mußte Mitte April

Tabelle 9

Die Zeit, die Zirbenzweige in überwärmter Küvette brauchen zur	Februar bis März	2. 4.	15. 4.	27. 4. grüner	29. 4. gelber
				Zweig desselben	Baumes
1. Aktivierung der Atmung . .	?	$^1/_2$ Tag	sofort		sofort
2. Aktivierung der Brutto-Assimilation	?	1 Tag	2 h		$^1/_2$ Tag
3. Kompensation der Atmung .	34 Tage	1 Tag	3 h		> 1 Tag
4. positiven Netto-Assimilation .	> 34 Tage	2 Tage	4 h	sofort	> 1 Tag

4 Std den hohen Temperaturen des Küvettenklimas ausgesetzt sein, bis die anfänglich vorherrschende CO_2-Ausscheidung in -Bindung überging. Erst am 27. 4., nach vorausgegangener frühlinghaft warmer Witterung, die die Schneedecke rasch abbaute und die Nadeln im Freien bis $+30^0$ C erwärmte, zeigte ein anderer Zweig der Zirbe W (Nr. 7) sofort nach Einschluß in die Küvette mit ansteigendem Licht positive Netto-Assimilation, die den ganzen Tag anhielt (Abb. 14a). Sie war aber noch sehr gering und entsprach bloß etwa der vom 5. 11. (Abb. 10), obschon der assimilierende Zweig bereits lebhaft grün gefärbt war. Offenbar standen rascherem Fortschritt der Photosynthese die immer noch beträchtlichen Nachtfröste (bis -11^0) entgegen (Abb. 3).

In der Zeit zwischen Mitte und Ende April ergrünten die meisten Zirbennadeln. Nur die am stärksten belichteten Teile der Baumkronen blieben auch um diese Zeit noch gelb (vgl. Abb. 6). Wenn die Regeneration des Chlorophylls Voraussetzung ist für energische Assimilation, müßten diese noch winterlich verfärbten Sonnenzweige immer noch CO_2 ausscheiden, obwohl gerade sie sich stärker erwärmten als die bereits aktiven grünen, schattenseitigen Kronenpartien. In der Tat blieb der Gaswechsel so eines gelblichen Zweiges der Zirbe H (Nr. 9), der noch nie in einer Küvette war, den ganzen Tag negativ (Abb. 14b, 29. 4.), obwohl die vorhergehende Nacht sogar frostfrei und der Tag warm war. Die CO_2Ausscheidung war schon am Vormittag sehr stark, ging am Nachmittag zurück, die Kurve beschrieb die hinlänglich bekannte Schleife nach oben, d. h. die Brutto-Assimilation nahm zu, konnte aber am selben Tag die Atmung nicht mehr ganz kompensieren. Der Gaswechsel des Zweiges entsprach etwa dem grünerer Zweige in den ersten Apriltagen (Tabelle 9).

Das verschiedene Verhalten gelber und grüner Zweige zum gleichen Zeitpunkt und bei gleicher Temperatur in der Küvette (Abb. 14b) beweist sehr eindringlich, daß die photosynthetische Aktivität nicht allein durch Wärme hervorgerufen wird, wenngleich diese eine bedeutende Rolle spielt, sondern auch einen bestimmten inneren Zustand der Pflanze u. a. die Regeneration des Chlorophyllapparates voraussetzt.

Der Übergang vom winterlichen zum sommerlichen Gaswechsel vollzieht sich bei weniger stark belichteten, daher grüner bleibenden Zirbenzweigen Ende April, bei extrem besonnten und stärker verfärbten etwas später. Voraussetzung für positive CO_2-Bilanz sind geöffnete Spalten und Neubildung des im Laufe des Winters verlorengegangenen Chlorophylls. Ausschlaggebend ist jedoch stärkere und länger anhaltende Erwärmung der Zweige, jedoch nicht frostfreie Nächte.

5. Der Gaswechsel nach dem Ausapern

Seit Mitte Februar wurde der Gaswechsel an Zweigen gemessen, die stets über die Schneedecke ragten, höchstens vorübergehend für kurze Zeit eingeschneit waren. In der zweiten Aprilhälfte aperten Kronenpartien aus, die sich seit Dezember unter der Schneedecke befanden. Auf die Nadeln dieser Zweige hatten während der Schneebedeckung weder nennenswerter Frost noch Wärme eingewirkt; sie enthielten im Spätwinter mehr Wasser und Chlorophyll als Nadeln höher inserierter, schneefrei gebliebener Zweige.

An einem Zweig der Zirbe H (Nr. 10) prüften wir den Gaswechsel unmittelbar nach der Ausaperung am 30. 4. Während die gelblichen Gipfelzweige desselben Baumes (Nr. 9) am Vortag noch negative CO_2-Bilanz zeigten, assimilierte der sattgrün gefärbte, eben ausgeaperte Zweig Nr. 10 am Morgen sofort positiv, am Mittag schon deutlich stärker als der Zweig 7 der Zirbe W am 27. 4. (Abb. 14a) und am späteren Nachmittag so lebhaft (0,35 mg CO_2 bei 3,7 cal) wie die Jungzirbe H_2 Ende Oktober bei ähnlichen Verhältnissen (vgl. Abb. 10).

Diese Feststellung veranlaßte mich, die Gaswechselmessungen an den 3 im Herbst geprüften Zirben (H_2, N_2 und W_1), die sich seit 8. 12., also fast 5 Monate unter Schnee befanden, Anfang Mai wieder aufzunehmen, um ihr Verhalten während der Ausaperung genau verfolgen zu können.

In den ersten Maitagen lagen die Küvetten noch einige Dezimeter unter der Schneeoberfläche. Die Strahlungsmeßinstrumente neben den Küvetten lieferten keinen Ausschlag, obwohl sie auf höchste Empfindlichkeit gestellt waren (1 Skt = 0,4 cal/cm² · h ≅ 500 Lux). Die Temperatur der Jungzirben betrug rund 0° und zeigte keine Tagesamplitude. Der CO_2-Gehalt der Küvetten- und Vergleichsluft war, wie im Dezember nach dem Einschneien, bedeutend höher als über der Schneedecke und differierte auf Grund der Bodenatmung, so daß daraus kein Rückschluß auf den Gaswechsel der Pflanzen unter der Schneedecke gezogen werden konnte.

Die Höhe der Schneedecke verringerte sich auffallend rasch, täglich um rund 5 cm. In 22 Tagen war die 1 m hohe Schicht auf der horizontalen Versuchsfläche verschwunden.

Am 6. 5. aperte als erste die Versuchszirbe H_2 aus; eine Woche später, am 12. 5., folgte die Zirbe W_1 und noch am selben Tag als letzte die Zirbe N_2. Erst einige Tage bevor sie ganz vom Schnee befreit wurden, erhielten die Pflanzen genügend Licht, daß sie sich tagsüber um einige Grade über den Nullpunkt erwärmten (Tabelle 10). Infolge rascher Schneeschmelze vollzog sich der Übergang von Finsternis zu vollem Tageslicht, von Temperaturkonstanz zu den großen täglichen Temperaturschwankungen, die um diese Jahreszeit über der Schneedecke auftraten (Tabelle 2 und 10), innerhalb von 3 Tagen!

Den Ablauf des Gaswechsels während und nach der Ausaperung im Mai wollen wir am Beispiel der Zirbe W_1 genau verfolgen. In den Morgenstunden des 12. 5. bedeckten die Küvette noch einige Zentimeter Schnee. Gegen 14 Uhr wurde der nach SW gerichtete Teil der Küvette frei. Wenige Stunden später ragte der ganze Behälter aus dem Schnee. Bereits um 12 Uhr, also während des Ausaperns, war die Assimilation der Zirbe W_1 sehr lebhaft und erreichte nach 2 Stunden, als die Ausaperung vollzogen war, die Höhe von 2,4 mg $CO_2/g \cdot h$ bei 14 cal und 8° C (Abb. 14a). In der folgenden Nacht sank die Temperatur bis auf —7° C. Demzufolge kam die Assimilation am nächsten Tag erst um 9 Uhr in Gang, blieb bis 13 Uhr niedrig, stieg dann rasch an und erreichte um 17 Uhr dieselbe Höhe wie am Vortag. Der Nachtfrost hemmte also zwar die Assimilation, jedoch ließ seine Wirkung rasch nach.

Im wesentlichen dieselben Ergebnisse brachten die Gaswechselmessungen der folgenden Tage und der anderen ausapernden Zirben: Wenn sie ans volle Tageslicht kommen, ist die Photosynthese bereits nach wenigen Stunden überaus lebhaft und uneingeschränkt. Nachtfrost hemmt sie auch jetzt noch, doch hält die Nachwirkung auf die Photosynthese im Gegensatz zum Herbst, wesentlich weniger an und wird durch die Erwärmung am Tage wieder völlig aufgehoben.

Die Tagessummen und Maxima der Assimilation der 3 Versuchszirben nach dem Ausapern (Tabelle 10) waren mindestens gleichhoch, meistens bedeutend höher als jene produktiver Tage im Oktober. Die Leistungen, die Anfang November nach wiederholten Frösten vor dem Einschneien und bevor sich die Spalten schlossen verzeichnet wurden, übertrafen sie um ein Vielfaches (Tabellen 6 und 7). Da die Pflanzen *sofort* positiv assimilierten, wenn sie aus dem Schnee kamen, andererseits vor dem Einschneien stark verringerte Aktivität zeigten, mußte sich also die Umstellung vom Winter- auf den Sommerzustand bereits unter der Schneedecke vollzogen haben (vgl. Cartellieri 1935). Ebenso wird unter Schnee der osmotische Wert rückreguliert, die Frosthärte verringert (Tranquillini 1957) und Chlorophyll neu gebildet. Diese Umstellungen werden durch das Fernbleiben stärkeren Frostes (kein wiederholtes Frieren und Auftauen der Nadeln!) und durch die Zunahme

Tabelle 10. *Netto-Assimilationstagessummen (mg CO_2/gT·d), -maxima (mg CO_2/gT·h), nach der Ausaperung. An Tagen wo die Meßwerte fehlen, wurde die Respiration keine Strahlungsmessung unter dem Schnee. Auch der Gaswechsel*

Datum	Witterung	Zirbe W_1								
		Assimilation		Strahlungssumme	Nadeltemperatur					
					in der Küvette			im Freien		
		Σ	Maximum		Minimum	Maximum	Mittel 6—17h	Minimum	Maximum	Mittel 6—17h
4. 5.	bewölkt	Gaswechsel unter Schnee nicht bestimmt								
5. 5.	bewölkt						0° konstant			
6. 5.	heiter									
7. 5.	bedeckt Regen									
8. 5.	heiter			0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9. 5.	heiter			3	—0,5	2,0	0,5	—0,5	2,0	0,5
10. 5.	bewölkt			5	—0,5	1,0	0,2	—0,5	1,0	0,2
11. 5.	bedeckt Schnee			10	—0,5	2,0	0,2	—0,5	2,5	0,3
					Ausaperung					
12. 5.	sonnig	8,3	2,4	97	—0,8	26,5	7,0	—2,0	10,0	3,4
13. 5.	klar	11,0	2,5	494	—7,0	32,5	14,8	—5,5	16,5	6,3
14. 5.	bewölkt	26,1	3,4	354	—3,5	23,0	10,5	—2,5	14,2	4,3
15. 5.	bedeckt Regen Schnee	—	—	59	—2,5	0,5	—0,8	—1,5	1,0	—1,5
16. 5.	sonnig	28,0	3,9	207	—3,0	23,0	8,6	—1,5	0,5	—0,5
17. 5.	bewölkt	28,8	3,4	462	—4,5	27,0	13,6	—2,5	9,5	1,7
18. 5.	bedeckt Schnee	34,4	3,9	226	0,0	16,5	9,0	0,0	8,0	2,6

des Wassergehaltes zweifellos begünstigt. In der Hauptsache dürften sie jedoch durch die Jahresrhythmik hervorgerufen werden. Man darf aber nicht übersehen, daß die Nadeln in der Finsternis unterm Schnee weniger Chlorophyll verlieren als die Pflanzenteile über diesem, daher bei ihnen eine der Voraussetzungen für die photosynthetische Aktivität während des ganzen Winters gegeben ist.

Wie wir gesehen haben, reagieren Pflanzen auf gleiche Umweltsverhältnisse im Spätherbst anders als im Frühjahr während des Übergangs zum Sommerzustand: Dieselbe Kälte bewirkt im Herbst stärkere und vor allem anhaltendere Aktivitätsabnahme als im Frühjahr, umgekehrt dieselbe Wärme im Frühjahr raschere und größere Aktivitätszunahme als im Herbst.

Da die Netto-Assimilation von Jungzirben, schon lange bevor sie einschneien (auf N-Hängen ab September, auf SW-Lagen ab Oktober) durch Fröste erniedrigt, ab November durch Spaltenschluß völlig stillgelegt war, bedeutet es für ihre Jahresproduktion in Hochlagen über

Strahlungstagessummen (cal/cm²·d) und Nadeltemperatur (°C) im Mai vor und gemessen bzw. war die Registrierung gestört. Bei der Zirbe H_2 vor der Ausaperung konnte vor dem Ausapern nicht exakt bestimmt werden

Zirbe H_2						Zirbe N_2					
Assimilation		Strahlungssumme	Nadeltemperatur in der Küvette			Assimilation		Strahlungssumme	Nadeltemperatur in der Küvette		
	Maximum		Minimum	Maximum	Mittel 6—17h	Σ	Maximum		Minimum	Maximum	Mittel 6—17h
			0,0	0,0	0,0						
			0,0	1,0	0,8						
			0,1	4,5	2,2				0° konstant		
Ausaperung											
—	—	—	0,8	—	—						
19,4	3,0	700	—2,8	29,9	19,4						
25,5	3,4	682	—3,9	29,9	19,4			0	0,0	0,0	0,0
26,3	2,7	585	0,2	33,0	20,1			3	0,0	0,7	0,4
29,6	3,2	317	—0,8	27,0	10,3			5	—0,5	0,2	—0,2
27,2	2,9	652	—2,8	24,0	13,1			8	—0,6	1,2	0,5
Ausaperung											
—	—	706	—4,9	32,0	21,5	7,4	1,3	26	—1,9	3,7	1,7
34,6	3,4	432	—2,0	26,5	14,7	19,0	2,2	146	—1,1	9,1	5,3
—	—	153	0,5	5,3	2,8	—	—	37	—0,5	4,0	1,4
—	—	738	—2,9	25,9	12,1	7,7	1,3	22	—1,2	4,1	2,0
24,1	2,9	520	—4,2	29,0	15,3	23,7	2,8	279	—3,3	27,5	12,6
34,2	3,5	280	1,0	16,4	8,6	27,1	2,8	227	0,2	17,0	9,4

Gaswechsel unter Schnee nicht bestimmt

der alpinen Waldgrenze keinen Gewinn, wenn der Schnee spät fällt bzw. die Schneebedeckung reliefbedingt lange oder ganz ausbleibt. Da hingegen die Jungzirben bereits Ende April durch Wärme und dank ihres endogenen Rhythmus unter wie über Schnee zu uneingeschränktem positiven CO_2-Gaswechsel befähigt sind, wird jede Verzögerung des Ausaperns, die klimatisch und orographisch bedingt sein kann die Jahresproduktion begrenzen.

Wie die Kartierung der Ausaperung zeigte, lagern sich vor allem in Mulden und auf SW-Hängen, die im Lee liegen, im Winter gewaltige Schneemassen ab, die erst spät wegschmelzen. Der letzte Schnee ging dort am 16. 7. 1955 weg, also $2^1/_2$ Monate nach dem möglichen Beginn der Stoffproduktion. In solchen lange schneebedeckten Lagen steht den Pflanzen für ihre Stoffproduktion eine allzu kurze Zeit zur Verfügung. Dies mag eine der Ursachen sein, daß die SW-Hänge baumlos bleiben, während die bedeutend früher ausapernden NW-Hänge mit zahlreichen Jungzirben bestockt sind!

Die Frage, ob Jungzirben unter der Schneedecke produktiv assimilieren, ist, obwohl sie experimentell nicht geklärt werden konnte, bei unserem Versuchsobjekt und -standort und bei den Schneeverhältnissen des Winters 1954/55 praktisch bedeutungslos, weil hierfür nur wenige Tage vor der vollständigen Ausaperung in Frage kommen.

Zusammenfassung

An einem zentralalpinen Standort im innersten Ötztal unmittelbar über der Waldgrenze in 2070 m Seehöhe wurde das Groß- und Kleinklima, vor allem die Nadeltemperatur in und außerhalb der Rezipienten, die Strahlung, die Bodentemperatur und der Gaswechsel spontan aufgegangener Jungzirben über und z. T auch unter Schnee im Winter 1954/55 laufend automatisch registriert, die Wasserbilanz und der Chlorophyllgehalt stichprobenweise geprüft.

Erste schwache Herbstnachtfröste können bereits im September die Umstellung der Jungzirben zum Winterzustand einleiten. Der osmotische Wert der Nadeln steigt durch Zunahme der osmotisch wirksamen Substanz aktiv, die Assimilation nimmt schon etwas ab. Ende Oktober ist das Assimilationsvermögen unter den gegebenen Umständen nur mehr halb so groß als im Mai bei gleichem Licht. Nur auf wärmeren Westhängen arbeiten sie noch fast uneingeschränkt. Die Summen sind infolge der Kürze des Tages natürlich auch hier geringer (Tabelle 7).

Mit dem Einsetzen starker Fröste (Anfang November) wird dann die Assimilation derart gehemmt, daß sie auf $^1/_{10}$ ihres ursprünglichen Betrages sinkt (Abb. 9). Auch die Respiration ist jetzt schwächer als früher. Da sie auf kurzfristige Erwärmung rascher anspricht als die Photosynthese kann es in der Sonne vorübergehend zu CO_2-Ausscheidung kommen (Abb. 10). Wird es dann richtig kalt (Mitte November, 8 Eistage mit Minima von —10 bis —15°, Nadeltemperaturminima bis —20°), so daß auch der Boden in der Wurzelsphäre (bei den benützten Jungzirben geht diese 15 cm tief) durchfriert, kommt zu der schon erwähnten kältebedingten teilweisen Lähmung des Photosyntheseapparates noch hygroaktiver Verschluß der Spalten hinzu infolge der Blockade der Wassernachleitung. Nun kann überhaupt kein Überschuß mehr erzeugt werden, die Photosynthese beschränkt sich bestenfalls auf die Verarbeitung des im Respirationsvorgang freigesetzten CO_2 im Innern der Nadeln. Nach außen tritt kein Gaswechsel mehr in Erscheinung (Abb. 11).

Zweige, die weiterhin über Schnee bleiben (größere Jungzirben) kompensieren infolge wiederholter Kältewellen am Licht nicht einmal mehr die Atmung, bei scharfem Frost erlahmt ihre Photosynthese völlig (PISEK und WINKLER 1957). Die Bilanz bleibt ständig negativ (schwache CO_2-Ausscheidung) selbst dann, wenn sich die Nadeln vorübergehend

über 0° erwärmen (Abb. 12). Starke Erwärmung reaktiviert zunächst bloß die Respiration, so daß die CO_2-Ausscheidung noch zunimmt (Abb. 13). Erwärmung bedeutet also in dieser Zeit bloß größeren Stoffverlust. Zum Teil ist der Tiefstand der Photosynthese zweifellos eine Folge des Chlorophyllabbaues, der in den Nadeln unter dem kombinierten Einfluß von Kälte und Strahlung, vielleicht auch Austrocknung vor sich geht und sich schon äußerlich an der besonders in Hochlagen auffälligen Umfärbung ins gelbliche verrät (Abb. 6).

Erst wenn die Temperatur anhaltend stärker steigt und das Schmelzwasser durch den Schnee in den Boden dringt und ihn auftaut — die Voraussetzung für das Wiederöffnen der Spalten — wird ihre Winterstarre gelockert, die Photosynthese läuft von Tag zu Tag lebhafter an, wenn nicht Wetterrückschläge entgegen wirken (Abb. 14a). Der Fortschritt ist bei den grünen Zweigen an der beschatteten Nordseite der Kronen größerer Stücke rascher als bei den noch stark gelblich verfärbten Nadeln der besonnten Südseite (Abb. 14b). Assimilationsvermögen und Chlorophyllgehalt hängen unverkennbar zusammen.

Der Gaswechsel der kleinen Jungzirben, die anfangs Dezember einschneiten und 5 Monate unter Schnee blieben, war nicht verläßlich meßbar (S. 617). Doch läßt sich sagen, daß 1. im Hinblick auf die Schneehöhe, die bis Ende April durchgehend mindestens $^1/_2$ m betrug, am Boden großer Lichtmangel herrschte (Abb. 4), daß 2. die Temperatur unter der Schneedecke mit ganz geringen Schwankungen sich bei 0 bis —1° hielt und 3. der Boden bis Ende März gefroren blieb (Abb. 3) — lauter Umstände, die nennenswerten Stoffgewinn unter Schnee unwahrscheinlich erscheinen lassen, obschon die Nadeln sich in seinem Schutz frisch grün erhalten und keine Wassersättigungsdefizite erleiden, im Gegenteil der Wassergehalt zunimmt. Solche eingeschneite Stücke sind, sobald sie schneefrei werden, sofort hochaktiv (Abb. 14a, 10. 5.). Die Umstellung zum Sommer erfolgt also noch unter Schnee, wahrscheinlich, weil sich infolge der außerordentlichen Konstanz der Temperatur unter seiner Decke der endonome Rhythmus unbehelligt durchsetzt.

Bei langer Dauer der Schneebedeckung (Mulden und Leehänge) kann sich der Beginn der Vegetationsperiode bis in den Juli hinein verzögern, was als eine der maßgeblichen Ursachen für die Baumlosigkeit solcher Lagen anzusehen ist.

Literatur

Aulitzky, H.: Über mikroklimatische Untersuchungen an der oberen Waldgrenze zum Zwecke der Lawinenvorbeugung. Wetter u. Leben **6**, 93 (1954). — Die Bedeutung meteorologischer und kleinklimatischer Unterlagen für Aufforstungen im Hochgebirge. Wetter u. Leben **7**, 241 (1955). — Bosian, G.: Über die Vollautomatisierung der CO_2-Assimilationsbestimmung und zur Methodik des Küvettenklimas. Planta (Berl.) **45**, 470 (1955). — Cartellieri, E.: Jahresgang von osmotischem Wert, Transpiration und Assimilation einiger Ericaceen der

alpinen Zwergstrauchheide und von Pinus cembra. Jb. wiss. Bot. **82**, 460 (1935). — DIMITZ, L.: Hüttenminimum oder Erdbodenminimum? Wetter u. Leben **1**, 321 (1949). — DIRMHIRN, I.: Einfache Sternpyranometer. Wetter u. Leben **6**, 132 (1954). — ECKEL, O., u. C. THAMS: Untersuchungen über Dichte-, Temperatur- und Strahlungsverhältnisse der Schneedecke in Davos. Geologie Schweiz, Hydrologie Liefg **3**, 275 (1939). — EGLE, K., u. A. ERNST: Die Verwendung des Ultrarotabsorptionsschreibers für die vollautomatische und fortlaufende CO_2-Analyse bei Assimilations- und Atmungsmessungen an Pflanzen. Z. Naturforsch. **4b**, 351 (1949). — FREY-WYSSLING, A.: Submicroscopic morphology of protoplasm, 2. Aufl. Amsterdam: Elsevier 1953. — GÄUMANN, E., C. ROTH u. J. ANLIKER: Über die Biologie der Herpotrichia nigra Hartig. Z. Pflanzenkrkh. **44**, 97 (1934). — GASSNER, G., u. G. GOEZE: Assimilationsverhalten, Chlorophyllgehalt und Transpirationsgröße von Getreideblättern mit besonderer Berücksichtigung der Kalium- und Stickstoffernährung. Z. Bot. **27**, 257 (1934). — GEIGER, R.: Das Klima der bodennahen Luftschicht. Braunschweig: F. Vieweg & Sohn 1950. — HENRICI, M.: Zweigipfelige Assimilationskurven. Mit spezieller Berücksichtigung der Photosynthese von alpinen phanerogamen Schattenpflanzen und Flechten. Verh. naturforsch. Ges. Basel **32**, 107 (1921). — The chlorophyll-content of grasses in Bechuanaland. 11. u. 12. Reports of the Director of Veterinary Education and Research, S. 259. 1927. — HUBER, B., u. J. POMMER: Zur Frage eines jahreszeitlichen Ganges im CO_2-Gehalt der Atmosphäre. Angew. Bot. **28**, 53 (1954). — KERÄNEN, J.: Wärme- und Temperaturverhältnisse der obersten Bodenschichten. Naturwissenschaftliche Monographien und Lehrbücher, Bd. 8, S. 169. Berlin: Springer 1929. — KESSLER, W., u. W. RUHLAND: Weitere Untersuchungen über die inneren Ursachen der Kälteresistenz. Planta (Berl.) **28**, 159 (1938). — LANGE, B.: Kolorimetrische Analyse. Weinheim: Verlag Chemie 1952. — MICHAEL, K.: Untersuchungen über die photosynthetische Leistung gelbblättriger Gehölze. Flora (Jena) **141**, 389 (1954). — MICHAELIS, P.: Ökologische Studien an der alpinen Baumgrenze. II. Die Schichtung der Windgeschwindigkeit, Lufttemperatur und Evaporation über einer Schneefläche. Beih. bot. Zbl., Abt. B **52**, 310 (1934a). — III. Über die winterlichen Temperaturen der pflanzlichen Organe, insbesondere der Fichte. Beih. bot. Zbl., Abt. B **52**, 333 (1934b). — IV. Zur Kenntnis des winterlichen Wasserhaushaltes. Jb. wiss. Bot. **80**, 169 (1934c). — MONTFORT, C.: Photochemische Wirkungen des Höhenklimas auf die Chloroplasten photolabiler Pflanzen im Mittel- und Hochgebirge. Z. Naturforsch. **5b**, 221 (1950). — MONTFORT, C., u. H. HAHN: Atmung und Assimilation als dynamische Kennzeichen abgestufter Trockenresistenz bei Farnen und höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **38**, 503 (1950). — NUERNBERGK, E.: Über Probleme der Gewächshausökologie. Ber. dtsch. bot. Ges. **1953**, 32. — PISEK, A., u. E. CARTELLIERI: Zur Kenntnis des Wasserhaushaltes der Pflanzen. III. Alpine Zwergsträucher. Jb. wiss. Bot. **79**, 131 (1933). — PISEK, A., u. W. LARCHER: Zusammenhang zwischen Austrocknungsresistenz und Frosthärte bei Immergrünen. Protoplasma (Wien) **44**, 30 (1954). — PISEK, A., u. R. SCHIESSL: Die Temperaturbeeinflußbarkeit der Frosthärte von Nadelhölzern und Zwergsträuchern an der alpinen Waldgrenze. Ber. naturwiss.-med. Verein, Innsbruck **47**, 33 (1947). — PISEK, A., H. SOHM u. E. CARTELLIERI: Untersuchungen über osmotischen Wert und Wassergehalt von Pflanzen und Pflanzengesellschaften der alpinen Stufe. Beih. bot. Zbl., Abt. B **52**, 634 (1935). — PISEK, A., u. W. TRANQUILLINI: Assimilation und Kohlenstoffhaushalt in der Krone von Fichten- (Picea excelsa LINK) und Rotbuchenbäumen (Fagus silvatica L.). Flora (Jena) **141**, 237 (1954). — PISEK, A., u. E. WINKLER: Wassersättigungsdefizit, Spaltenbewegung und Photosynthese. Protoplasma (Wien) **46**, 597 (1956). — Assimilation der Fichte im Winter an der Waldgrenze und in Tallage. Noch nicht veröffentlicht. —

Reinau, E.: Schwellenwert der CO_2 in Luft der Grüngrenze eines Zuckerrübenschlages bei Gewitterregen. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 44 (1954). — Sauberer, F.: Über die Schneedeckenverhältnisse Niederösterreichs und das Mikroklima im Schnee. Zbl. ges. Forst- u. Holzwirtsch. **70**, 138 (1947). — Schmidt, E.: Baumgrenzenstudien am Feldberg im Schwarzwald. Tharandter forstl. Jb. **87**, 1 (1936). — Seybold, A., u. A. Weissweiler: Zur Klärung einiger elementarer optischer Fragen der Photophysiologie. Bot. Archiv **44**, 456 (1943). — Stålfelt, M. G.: Periodische Schwankungen im Chlorophyllgehalt wintergrüner Pflanzen. Planta (Berl.) **4**, 201 (1927). — Die Abhängigkeit der Spaltöffnungsreaktionen von der Wasserbilanz. Planta (Berl.) **8**, 287 (1929). — Die Spaltöffnungsweite als Assimilationsfaktor. Planta (Berl.) **23**, 715 (1935). — Tranquillini, W.: Über den Einfluß von Übertemperaturen der Blätter bei Dauereinschluß in Küvetten auf die ökologische CO_2-Assimilationsmessung. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 191 (1954). — Die Bedeutung des Lichtes und der Temperatur für die Kohlensäureassimilation von Pinus Cembra-Jungwuchs an einem hochalpinen Standort. Planta (Berl.) **46**, 154 (1955). — Die Frosthärte der Zirbe unter besonderer Berücksichtigung autochthoner und aus Forstgärten stammender Jungpflanzen. Forstwiss. Centralbl. (im Druck). — Turner, H.: Über das Strahlungs- und Lichtklima einer Hangstation der Ötztaler Alpen bei Obergurgl. Arch. Meteor., Geophys. u. Bioklim. (im Druck). — Walter, H.: Die Hydratur der Pflanze. Jena: Gustav Fischer 1931. — Ökologische Pflanzengeographie. Fortschr. Bot. **3**, 178 (1934). — Zacharowa, T. M.: Über den Gasstoffwechsel der Nadelholzpflanzen im Winter. Planta (Berl.) **8**, 68 (1929). — Zeller, A.: Untersuchungen über Chlorophyllgehalt, Trockengewicht und Aschengehalt in Abhängigkeit von Seehöhe und Jahreszeit. Beih. bot. Zbl. **54**, 19 (1936). — Zeller, O.: Über Assimilation und Atmung der Pflanzen im Winter bei tiefen Temperaturen. Planta (Berl.) **39**, 500 (1951).

Dr. W. Tranquillini, Innsbruck (Österreich), Wildbachverbauung
Wilhelm-Greil-Straße 9

Autorenverzeichnis des 49. Bandes

Barth, H., Spektrale Reflexion und Remission an Blättern und blattähnlichen Organen. S. 103

Engel, H. s. Friederichsen, I. S. 578

Ferling, E., Die Wirkungen des erhöhten hydrostatischen Druckes auf Wachstum und Differenzierung submerser Blütenpflanzen. S. 235

Franke, W., Der Vitamin C-Gehalt von Pflanzen in Abhängigkeit von der Temperatur und das Verhältnis Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure unter besonderer Berücksichtigung gelagerter Kartoffeln. S. 345

Frenzel, B., Zur Abgabe von Aminosäuren und Amiden an das Nährmedium durch die Wurzeln von Helianthus annuus L. S. 210

Friederichsen, I., und H. Engel, Beiträge zur Kenntnis des Abschußrhythmus und des Farbstoffs von Sphaerobolus stellatus (Thode) Pers. S. 578

Guttenberg, H. v., und H. Müller, Die laterale Anisophyllie von Coleus hybridus als Korrelationsphänomen. S. 271

— s. Wiedow-Pätzold, H.-L. S. 588

Hager, A., Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen. S. 524

Hahn, I. M. s. Ruge, U. S. 205

Haupt, W., Die Induktion der Polarität bei der Spore von Equisetum. S. 61

Jacobi, G., Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels in Extrakten von Ulva lactuca. S. 1

— Enzyme des Aminosäure-Stoffwechsels in Ulva lactuca. Transaminasen und Aminosäure-Dehydrogenasen. S. 561

Junges, W., Beziehungen zwischen der photoperiodischen Angepaßtheit der Pflanzen und der geographischen Breite ihrer Heimat. S. 11

Kaldewey, H., Wachstumsverlauf, Wuchsstoffbildung und Nutationsbewegungen von Fritillaria meleagris L. im Laufe der Vegetationsperiode. S. 300

Kessler, E., Stoffwechselphysiologische Untersuchungen an Hydrogenase enthaltenden Grünalgen. I. Über die Rolle des Mangans bei Photoreduktion und Photosynthese. S. 435

— Untersuchungen zum Problem der photochemischen Nitratreduktion in Grünalgen. S. 505

Kiermayer, O. s. Linser, H. S. 498

— s. Youssef, E. S. 607

Linser, H., und O. Kiermayer, Zellphysiologische Untersuchungen über die Wirkung von 3-Aminotriazol und 3-(α-Iminoäthyl)-5-methyl-tetronsäure als spezifische Chlorophyllbildungshemmstoffe bei *Elodea canadensis*. S. 498

Milovidov, P., Zur Frage des sogenannten Golgi-Apparates („Apparato reticolare interno"). S. 91

Mohr, H., Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypocotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von Sinapis alba L. (= Brassica alba Boiss.). S. 389

Müller, H. s. Guttenberg, H. v. S. 271

Muschik, M., Entwicklungsmorphologische Studien am Vegetationskegel von Hordeum distichum (Ackermanns ISARIA-Gerste) in Abhängigkeit von Tageslänge und Lichtintensität. S. 598

Raadts, E., und H. Söding, Chromatographische Untersuchungen über die Wuchsstoffe der Haferkoleoptile. S. 47

Rackow, B., Der Vergleich der assimilatorischen Umsätze von Chlorella pyrenoidosa im „Warburg-Gemisch" (p_H 8,8) und im „Emerson-Gemisch" (p_H 9,4). S. 489

— Ist die pflanzliche Photosynthese eine Lichtreaktion mit rückläufiger Dunkelreaktion? Ein Versuch, den Kreisprozeß mit Ferrobicarbonat nachzuweisen. S. 494

Reimers, I., Vergleichende zellphysiologische Studien an einigen etiolierten und grünen mono- und dicotylen Pflanzen. S. 455

Reznik, H., Die Pigmente der Centrospermen als systematisches Element. II. Untersuchungen über das ionophoretische Verhalten. S. 406

Ruge, U., und I. M. Hahn, Papierchromatographische Trennung verschiedener Auxine in verdünnten Salatextrakten. S. 205

Schwemmle, J., Der Samenansatz bei Kreuzungen mit der Oenothera Berteriana ♀ nach Früh- und Spätbestäubung. S. 135

— Das unterschiedliche Reifen und Altern der Samenanlagen in den verschiedenen Abschnitten des Fruchtknotens der Oenothera Berteriana. S. 168

Söding, H. s. Raadts, E. S. 47

Thielke, Ch., Über Differenzierungsvorgänge bei Cyperaceen. II. Entstehung von epidermalen Faserbündeln in der Scheide von Carex. S. 33

Tranquillini, W., Standortsklima, Wasserbilanz und CO_2-Gaswechsel junger Zirben (Pinus cembra L.) an der alpinen Waldgrenze. S. 612

Wiedow-Pätzold, H.-L., und H. v. Guttenberg, Weitere Untersuchungen über den nativen Wuchsstoff. S. 588

Youssef, E., und O. Kiermayer, Zur Photolyse von Indol-3-Acetonitril. S. 607